Aus der Abteilung Laboratoriumsdiagnostik der
Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta, F. R. C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Die Auswirkung der Ovarektomie auf den Serumgonadotropinspiegel in der Zeit von zehn Tagen post operationem in Abhängigkeit vom sexuellen Reifestadium bei weiblichen Ratten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
ROSELINE HIPP
aus Sigmaringen

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547616_0005

Aus der Abteilung Laboratoriumsdiagnostik der
Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta, F. R. C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Die Auswirkung der Ovarektomie auf den Serumgonadotropinspiegel in der Zeit von zehn Tagen post operationem in Abhängigkeit vom sexuellen Reifestadium bei weiblichen Ratten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
ROSELINE HIPP
aus Sigmaringen

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. W. Frommhold
1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Gupta
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. E. Keller

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)

Für die Anregungen und die Unterstützung dieser Arbeit danke ich Herrn Professor Dr. D. Gupta.

INHALTSVERZEICHNIS

1. E i n l e i t u n g 1

2. P r o b l e m s t e l l u n g 5

3. M a t e r i a l i e n und R e a g e n z i e n .. 7

4. M e t h o d e n und
V e r s u c h s b e s c h r e i b u n g e n 9

4.1 Ovarektomie 9
4.1.1 Das Ovar (anatomische Verhältnisse) 9
4.1.2 Operationsvorgang 10
4.2 Serumgewinnung 11
4.3 Radioimmunassay-Methode (RIA - allgemein) 11
4.4 Jodierung des Hormons 12
4.5 Nachreinigung 13
4.6 B - O - Bindung 13
4.7 Messung der Radioaktivität 14
4.8 Radioimmunassay-Methode (speziell) 14

5. E r g e b n i s s e 18
5.1 20 Tage alte Ratten (Vorpubertät) 18
5.1.1 Serum FSH-Spiegel nach Ovarektomie 18
5.1.2 Serum LH-Spiegel nach Ovarektomie 18
5.1.3 Verhältnis FSH zu LH nach Ovarektomie 18
5.1.4 Gewichtsentwicklung nach Ovarektomie im Gegensatz zu intakten Kontrollgruppen 19
5.2 35 Tage alte Ratten (Pubertät) 19
5.2.1 Serum FSH-Spiegel nach Ovarektomie 19
5.2.2 Serum LH-Spiegel nach Ovarektomie 19
5.2.3 Verhältnis FSH zu LH nach Ovarektomie 20
5.2.4 Gewichtsentwicklung nach Ovarektomie im Gegensatz zu intakten Kontrollgruppen 20
5.3 56 Tage alte Ratten (eben reif geworden) 20
5.3.1 Serum FSH-Spiegel nach Ovarektomie 20
5.3.2 Serum LH-Spiegel nach Ovarektomie 20
5.3.3 Verhältnis von FSH zu LH nach Ovarektomie 21
5.3.4 Gewichtsentwicklung nach Ovarektomie im Gegensatz zu intakten Kontrollgruppen 21

5.4 90 Tage alte Ratten (Reife) 21
5.4.1 Serum FSH-Spiegel nach Ovarektomie 21
5.4.2 Serum LH-Spiegel nach Ovarektomie 21
5.4.3 Verhältnis von FSH zu LH nach Ovarektomie 22
5.4.4 Gewichtsentwicklung nach Ovarektomie im Gegensatz zu intakten Kontrollgruppen 22

6. S c h a u b i l d e r 23

7. T a b e l l e n 43

8. D i s k u s s i o n und Z u s a m m e n f a s s u n g 47

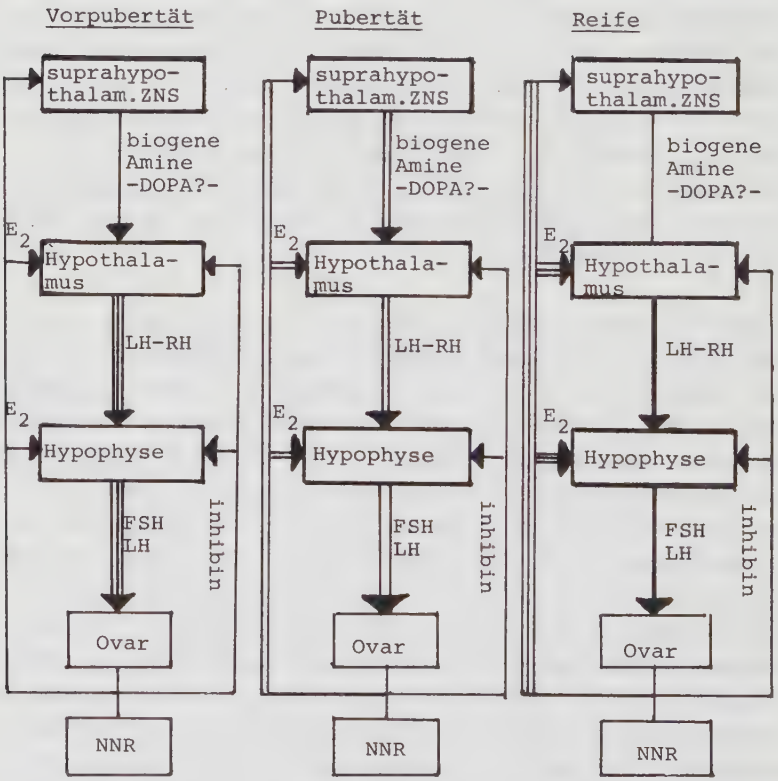
9. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s 53

1. Einleitung

Der Zeitraum vom Einsetzen der Entwicklung der sekundären Geschlechtsmerkmale bis zum Erwerb der Fortpflanzungsfähigkeit, wird unter dem Begriff Pubertät subsummiert (Gupta[7]). Nach Steele[30,31] (1977) ist Pubertät bei der weiblichen Ratte mit einer Abnahme der Sensitivität von Rezeptoren verbunden. Es handelt sich dabei um Chemorezeptoren im Hypothalamus, die hauptsächlich auf ovarielles Östradiol ansprechen. Sie setzen dann LH-RH frei. Das bewirkt, daß die Hypophyse ihre LH- bzw. FSH-Speicher entleert. Es wird außerdem vermutet, daß Östradiol direkt die Hypophyse zur Gonadotropinsynthese und Freisetzung anregt (Ojeda[21]). Die Vermutung, daß Östradiol selbst für den Wechsel der Ansprechbarkeit der Rezeptoren in der Pubertät verantwortlich ist, kommt dadurch, weil das Alter in dem diese Veränderung beobachtet wird durch Östradiolgaben vorgerückt werden kann (Steele and Weisz[30]).

Lange Zeit war es völlig unbekannt, wie ein Vorgang, wie die Pubertät, überhaupt zustande kommt. 1932 nahmen Hohlweg und Junkmann[14] an, daß für die Hemmung der Gonadotropinsekretion in der Kindheit ein Sexualzentrum im Gehirn verantwortlich sein könnte. Sie vermuteten, daß dieses Zentrum die Registrierstelle für die Gonadenhormone sei. Mit Beginn der Pubertät sollte sich ihrer Meinung nach die Empfindlichkeit dieser Registrierstelle langsam auf ein niedrigeres Niveau einstellen. Für sie war das die Erklärung, weshalb von jetzt an ein höherer Gonadotropinspiegel vorhanden ist. Der Zusammenhang Hypothalamus-Hypophyse-Geschlechtsorgan war somit hergestellt. Der spezielle Zusammenhang von Hypothalamus und Hypophyse blieb offen, bis 1955 von Harris[13] nachgewiesen werden konnte, daß die hypothalamische Wirkung durch neurohumorale Regulation über das Pfortadersystem an den Hypophysenvorderlappen weitergegeben wird. Schally und Mitarbeiter[22-26] bezeichneten die Hypothalamus-Hormone als Releasing Hormons, extrahierten sie und wiesen ihre hypophysotrope Wirkung nach.

Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurden in der Folgezeit zahlreiche Versuche sowohl mit männlichen als auch mit weiblichen Versuchstieren durchgeführt(Gupta[7-9],Donovan[5],Grumbach[6]). Bei weiblichen Ratten wurden die Gonadenhormonspiegel im Serum und in der Hypophyse bestimmt, nach Ovarektomie und bei intakten Tieren. Es zeigte sich, daß es durchaus richtig ist, einen solchen Regelkreis anzunehmen der in unterschiedlichen Reifestadien auf unterschiedliche Sollwerte eingestellt ist.



E_2 = Östradiol

Abb.1: Regelkreis in verschiedenen Reifestadien

Es galt nun, herauszufinden, in welchem Zeitraum der Gonadostat seine Empfindlichkeit umstellt und welche Konsequenzen der Wechsel für die Höhe des Hormonspiegels hat.
Dazu wurden bei weiblichen Ratten die Gonadenhormonspiegel im Serum und in der Hypophyse bstimmt, nach Ovarektomie und bei intakten Tieren. Es stellte sich heraus, daß bei vorpubertalen intakten Ratten der Serumhormonspiegel von FSH im Vergleich zu älteren Ratten hoch war. Nach Ovarektomie erhöhte sich dieser Spiegel noch stark.
Um die Funktion des Ovars im Regelkreis zu überprüfen, wurde den ovarektomierten Tieren Östradiol in verschiedenen Konzentrationen zugeführt. Es zeigte sich: eine geringe Konzentration von Östradiol genügt, um die Funktion des Ovars bei vorpubertalen Tieren zu ersetzen. Das absolut gemessene Serum LH konnte durch das Östradiol weniger deutlich beeinflußt werden als das Serum FSH. Hier zeigten sich starke individuelle Schwankungen und ein insgesamt pulsativer Verlauf (Keller[15], Gupta[11]).
Bei pubertären intakten Weibchen war der Serum-FSH-Spiegel deutlich niedriger. Auch hier stieg die Serum-FSH-Konzentration nach Ovarektomie an; er konnte ebenfalls mit Östradiol auf Normalwerte zurückgebracht werden, allerdings war eine höhere Östradiol-Konzentration notwendig. Das Serum LH verhält sich ähnlich wie bei präpubertalen Tieren.
Erwachsene intakte Ratten weisen einen zyklusabhängigen Serum-FSH-Spiegel auf der im sogenannten Diöstrus am niedrigsten ist. Untersuchungen zum Zyklus wurden zahlreiche durchgeführt, u.a. von Smith[28], Neill[19], Steele and Weisz[30], Yen[35]).
Um bei ovarektomierten erwachsenen Tieren Serum-FSH-Konzentrationen zu erreichen, wie sie intakte Tiere im Diöstrus aufweisen, sind relativ hohe Östradiol-Dosen notwendig. Auch bei dieser Altersgruppe bestätigte sich: die absolut gemessene Menge LH unterliegt weniger stark der Östradiolwirkung als die FSH-Konzentration; individuelle Schwankungen sind ausgeprägt, der Spiegel ändert sich pulsativ, er ist tageszeit- und zyklusabhängig (Steele and Weisz[30]).

Die Frage, weshalb in einem bestimmten Lebensabschnitt (Pubertätsbeginn) dieser Wechsel der Sensitivität des Gonadostaten im Hypothalamus stattfindet, blieb bisher ungeklärt. Sicher ist, daß extrahypothalamische Einflüsse eine Rolle spielen, z.B.: Umwelteinflüsse, Ernährungszustand, Streß, chronologisches Alter (Gupta[10], Gupta, Voelter[8], Negro-Vilar[18], Steele and Weisz[30], Goldberg[12], Merk[17]).

Gezielte Untersuchungen zum Regelkreis Hypothalamus-Hypophyse-Sexualorgan ergaben: Stimulation mit unterschiedlichen Östradiolkonzentrationen rufen im Hypothalamus hemmende bzw. fördernde Wirkung auf die Freisetzung von LH-RH und folglich auf die Hypophyse hervor. Ein positiver und ein negativer Feedback-Mechanismus müssen angenommen werden (Steele and Weisz[30,31], Andrews and Ojeda[1]). Mit dem positiven Feedback-Mechanismus wurden auch in einigen Studien die Hormonverhältnisse bei unreifen Tieren erklärt (hohe FSH- und LH-Spiegel als Level) (Dohler, Wuttke[4], Chritchlow[3], Andrews and Ojeda[2]).

Nachdem nun also der Regelkreis als existent angesehen wird, ist es notwendig, daraufhinzuweisen, daß hier ein System komplex ineinandergreifender Faktoren vorhanden, ist, die nicht unabhängig voneinander betrachtet werden können.

2. Problemstellung

Das Thema der folgenden Arbeit:

1) Wie verhält sich der Serum-FSH- bzw. LH-Spiegel nach Ovarektomie

   a) bei 20-tägigen Ratten - Vorpubertät -
   b) bei 35-tägigen Ratten - Pubertät -
   c) bei 56-tägigen Ratten - gerade der Pubertät entwachsen -
   d) bei 90-tägigen Ratten - Reife -

   im Laufe von 10 Tagen?

2) Gibt es Peaks?

3) Wie verhält sich das Gewicht?

Diese Probleme traten auf, als wir Einzelfragen um Regelkreis Hypothalamus-Hypophyse-Ovar während verschiedener Reifestadien untersuchen wollten. Diese Fragen lauteten:

1. gibt es in der Pubertät einen dauernd erhöhten Gonadotropinspiegel?
2. welche Effekte hat die Ovarektomie auf die Gonadotropine in verschiedenen Reifestadien?
3. die Schwellenwertänderung der Rezeptoren im Hypothalamus auf Östradiol während der Pubertät sollte bestätigt werden.

Der Versuchsablauf der für die Beantwortung dieser Fragen festgelegt war, sieht so aus:

Gruppe 1 - Intakt

Alle Altersgruppen erhalten Kochsalz, anschließend wird der Serum-FSH- und LH-Spiegel bestimmt (bei adulten und adolescenten Ratten unter Beachtung der Zyklusphase).

Gruppe 2 - Ovarektomiert

Die Tiere jeder Alterstufe werden zuerst ovarektomiert und erhalten eine Kochsalzinjektion, anschließend Hormonspiegelbestimmung.

Gruppe 3 - Intakt + E_2

Alle Altersgruppen erhalten in einer bestimmten Zyklusphase Östradiol-Injektionen verschiedener Konzentrationen (D I = 0,2 ug/100 g KG, D II = 1,0 ug/100 g KG, D III = 5,0 ug/100 g KG). Acht Stunden nach Östrogen-Gabe werden die Tiere dekapitiert. Der Serumhormonspiegel wird bestimmt.

Gruppe 4 - Ovarektomiert + E_2

Die Tiere sollten zunächst operiert (ovarektomiert) und anschließend mit den vorher genannten Konzentrationen von Östradiol gespritzt werden.

Bei ovarektomierten Tieren sollte die Östradiolgabe dann erfolgen, wenn der Gonadotropinspiegel am höchsten ist. Da dieser Zeitpunkt nicht bekannt ist, wurde diese ausgedehnte pilot-study angesetzt.

3. Materialien und Reagenzien

Faden: Ethilon FS-2
EH 7506

Nadelhalter

Chirurgische Schere

Chirurgische und anatomische Pinzetten

Äther pro Narkose

Fa. MERCK, Darmastadt

Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H_2O	Nr. 6580
Natriumdihydrogenphosphat x 2 H_2O	Nr. 6345
Natriumchlorid	Nr. 6404
Kaliumjodid neutral	Nr. 5043
Äthylendinitrilotetraessigsäure	Nr. 8436
Chloramin T (Trihydrat)	Nr. 2426
Natriumpyrosulfit	Nr. 6528
Chloroform	Nr. 2445
Bromphenolblau	Nr. 8122
Äther	Nr. 921

Fa. SERVA-Feinbiochemika, Heidelberg

Saccharose reinst	Nr.35580
Äthylmercurithiosalicylsäure	Nr.11375

BERINGWERKE, Marburg/Lahn
Rinderserumalbumin

WELCOME Reagents Ltd., Beckenham, England
Rabbit Serum inactivated
Precipitatin Serum for Radio-immunoassay
(Anti-Rabbit Gamma-Globulin)

RADIOCHEMICAL CENTRE, Amersham
Jod - 125 (Na-Salz) IMS. 30

NATIONAL INSTITUTE OF ARTHRITIS AND METABOLIC DESEASES AND DISORDERS (NIAMDD), Bethesda MD., USA
Purified Rat Luteinizing Hormone
(NIAMDD-Rat LH-I-3)
Antiserum to Rat Luteinizing Hormone
(NIAMDD-Anti-Rat LH Serum-1)
Reference Preparation
(NIAMDD-Rat LH-RP-1)

Purified Rat Follicle Stimulation Hormone
(NIAMDD-Rat FSH-I-1)
Antiserum to Rat Follicle Stimulation Hormone
(NIAMDD-Anti-Rat FSH Serum-6)
Reference Preparation
(NIAMDD-Rat FSH-RP-1)

FARBWERKE HOECHST AG, FRANKFURT-HOECHST

Synthetisches LH-RH

Elutionspuffer für die Jodierung: pH 7,6

13,2 ml o,1 M $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$
+ 86,8 ml O,1 M $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$
+ 8,7 g NaCl = O,15 M
+ 100 mg Merthiolat = O,01 %
ad 1 l H_2O dest. = O,01 M Phosphat-puffer

Diluent: pH 7,6

Elutionspuffer für die Jodierung
+ 1 % Rinderserumalbumin

Stammpuffer: pH 7,6

3,45 g $NaH_2PO \times 2H_2O$
+ O,8737 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$
pH Angleich mit 1 N NaOH
ad 500 ml H_2O dest.

Assaypuffer: pH 7,6

Elutionspuffer für die Jodierung
+ 18,6 g EDTA
+ 3,0 ml Rabbitserum
ad 1 l H_2O dest.

Transferlösung:

1 % KJ
+ 16 % Sucrose in P 1
+ Bromphenolblau (Spur)

2 % BSA Lsg.:
2 g Rinderserumalbumin in Elutionspuffer für die Jodierung

4. Methoden und Versuchsbeschreibung

Wir arbeiteten mit weiblichen Ratten des Wistar-Stammes aus der Versuchstieranstalt Dr. Ivanovas (Kißlegg/Allgäu). Die Tiere befanden sich in Gemeinschaftskäfigen zu je fünf. Sie hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Raumtemperatur betrug 20° C; von 6°° Uhr bis 19°° Uhr wurde der Raum künstlich beleuchtet. Die Adaptationszeit betrug 4 Tage. Die Ratten waren

20 Tage - Vorpubertät -
35 Tage - Pubertät -
56 Tage - gerade der Pubertät entwachsen -
90 Tage - Reife -

alt, als sie operiert wurden.

4.1 Ovarektomie

4.1.1 Das Ovar (anatomische Verhältnisse)

Die linsenförmigen Ovarien haben eine unregelmäßige, knotige Oberfläche und eine rötliche Farbe. Ein einzelnes ausgewachsenes Ovar wiegt rd. 60 mg und mißt 5 x 4 x 3 mm (Fränkel 1905, Drahn 1926, Preissecker 1931, Schuhmacher 1973). Das rechte Ovar befindet sich in situ am lateralen Rand des M.psoas major in Höhe von L4 - L6 der Wirbelsäule und 7 bis 12 mm unterhalb der Niere. Das linke Ovar liegt in Höhe von L5/L6, 3 bis 5 mm caudal der Niere und ebenso entlang des lateralen Randes des M.psoas major. Das linke Ovar befindet sich ungefähr 11 mm von der Mittellinie entfernt im Gegensatz zu 15 mm des rechten Ovars. Das Ovar ist von einem einfachen Zylinderepithel bedeckt, das am Hilus in das Plattenepithel der Bursa ovarica übergeht. Die Tunica albuginea ist 5 bis 16 mm dick.

4.1.2 Operationsvorgang

Nach 3 bis 4 Tagen Adaptationszeit im Tierstall der Kinderklinik Tübingen bei oben definierten Bedingungen werden die Ratten unter Äther-Narkose ovarektomiert. Die Ratte wird so lange in ein Standglas mit Deckel, in dem sich ein Äther- Luftgemisch befindet, gesperrt, bis sie das Narkosestadium III = Toleranzstadium erreicht hat. Dieses Stadium wird während des Operationsvorganges aufrechterhalten, indem die Ratte einen äthergetränkten Wattebausch unter die Schnauze gelegt bekommt. Es ist wichtig, die Atmung genau zu überwachen, um bei Atemstillstand sofort mit einer Fahrradpumpe reanimieren zu können. Vor dem Eingriff wird die Ratte gewogen und mit wasserfestem Filsstift markiert (Ohrläppchen). Weil die Ratten ein außerordentlich wirksames Properdinsystem besitzen, sind keine aseptischen OP-Bedingungen nötig.
Der Zugang zu den Ovarien erfolgt von dorsal her. Wir setzen einen Hautschnitt längs der Mittellinie in Höhe von L4 bis L6 der Wirbelsäule. Die Haut wird zunächst nach links vom M.rectus abdominalis freipräpariert bis zum lateralen Rand des M.psoas major. Hier wird eine helle Stelle sichtbar. Es handelt sich um durchscheinendes Fettgewebe in das die Ovarien eingebettet sind. Mit einem kleinen Schnitt durch die Fascie des M.rectus abdominalis wird die Bursa ovarica eröffnet. Mit einer chirurgischen Pinzette wird das Ovar ergriffen und herausgezogen. Mit Ethicon-Faden binden wir die Tube ab. Oberhalb der Ligatur wird das Ovar abgesetzt, der Stumpf reponiert.
Da die Ovarektomie ein verhältnismäßig unblutiger Eingriff ist, war es nicht nötig, die kleine Öffnung durch eine Naht zu verschließen. Unter Beachtung der anatomischen Seitendifferenz wird der Vorgang auf der rechten Seite wiederholt. Der Hautschnitt wird vernäht und die Ratte in den Käfig zurückgelegt.

Durch laufende Beobachtung lernten wir, daß es nötig ist, die ovarektomierten von den intakten Ratten zu trennen, da diese die Wunden anfressen. Die operierten Tiere erholen sich schnell von der Operation und der Narkose.

4.2 Serumgewinnung

An bestimmten Tagen werden die Tiere zur Blutentnahme mittels Scherenschlag dekapitiert und entblutet. Sie werden vorher mit Äther betäubt. Das Blut wird mit einem Trichter in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Danach bleibt das Blut wenigstens eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur zur Gerinnung stehen. Anschließend wird es in einer Tischzentrifuge (Firma Christ, Typ UJ 2) bei 3000 Umdrehungen pro Minute 10 Minuten lang zentrifugiert. Das Serum wird dann abpipetiert und bei -20° C bis zum Assay aufbewahrt.

4.3 Radioimmunassay-Methode (RIA - allgemein)

Steroidhormone können aus den Körperflüssigkeiten extrahiert werden, sie können gereinigt werden und sind dann mit analytischen Reagenzien in spezifischen Reaktionen nachweisbar. Im Gegensatz dazu sind die aus mehreren verschiedenen Aminosäurebausteinen aufgebauten Proteo-Hormone in eiweißhaltigem Milieu wie dem Blutplasma chemisch nicht bestimmbar, da ihnen spezifische Gruppen fehlen. Zuerst wurden diese Substanzen deshalb über ihre biologische Wirkung auf Versuchstiere nachgewiesen. Die Standardisierung der Methode war der Bio-Assay, der im allgemeinen jedoch zu unempfindlich für Konzentrationsmessungen im physiologischen Bereich ist. Solche Konzentrationsmessungen konnten erst durchgeführt werden, als die RIA-Methode entwickelt war. Diese Methode beruht darauf, daß in einem immunologischen System das Antigen (hier: Glykoprotein FSH-LH) von einem hochspezifischen Proteinmolekül, dem Antikörper, erkannt und in einem Komplex aus beiden Molekülen gebunden wird. Aufgrund der Größe des Antigen-Antikörperkomplexes ist es möglich, eine physikalisch-chemische Trennung von

anderen Proteokomponenten des Systems durchzuführen. Bei der Bestimmung von physiologischen Konzentrationen von Proteohormonen wird die Austauschbarkeit eines (z.B. radioaktiv) markierten Antigens im Antigen-Antikörper-Komples durch ein unmarkiertes Antigen ausgenutzt. Das "kalte" = unmarkierte Hormon und das radioaktiv-markierte konkurrieren also um die Bindungsstelle des spezifischen Antikörpers.

Nach einer definierten Inkubationszeit stellt sich zwischen den Reaktionspartnern ein Fließgleichgewicht ein. Der Antikörper ist weitgehend mit markiertem und nichtmarkiertem Hormon gesättigt. Je mehr "kaltes" Hormon, sprich Serum-FSH oder Serum-LH vorhanden ist, umso weniger bindet der Antikörper radioaktives Hormon. (GG verschiebt sich zugunsten des Überschusses). Das "kalte" Hormon ist in diesem System die "Unbekannte". Die Menge radioaktiv markierten Hormons und die Menge Antikörper sind definiert. Für die Mengenbestimmungen eines Hormons in einer Probe wird ein zweiter Ansatz gemacht. Mit diesem Ansatz, in dem Standardverdünnungen mit bekannten Mengen von unmarkiertem Hormon eingesetzt werden, kann nacher ein Vergleich angestellt werden (erstellen einer Eichkurve). Die Standard- oder Eichkurve wird so erstellt, daß man die Ergebnisse dieses zweiten Ansatzes nach steigender Konzentration des freien Antigens (Hormons) aufträgt. (Siehe Eichkurve für LH bzw. FSH).

4.4 Jodierung des Hormons (Chloramin-T-Methode)(108)

Reihenfolge des pitettierens bei der Jodierung

1. 2 ug (normalerweise in 20 ul Puffer) des Hormons
2. 20 ul des 0,5 M Phosphatpuffers
3. 0,5 mCi J^{125} (entsprechen normaerweise 5 ul Lösung)
4. 10 ul Chloramin T ' 25 mg in 50 ml 0,01 M Phosphatpuffer gelöst)

5. Reaktionszeit 1 Minute; dabei auf einem Schüttelgerät Typ Rotamixer, Fa. Hock + Tucker HT) schütteln
6. 30 ul Natriumpyrosulfit (125 mg in 50 ml 0,01 M Phosphatpuffer gelöst)
7. 100 ul Transferlösung
8. Übertragung des Reaktionsgemisches auf die Sephadexsäule (G-75-Füllung)
9. Reaktionsgefäß mit 2 mal 20 ul 2% BSA Lösung nachspülen und ebenfalls auf die Sephadexsäule übertragen
10. Sephadexsäulenfüllung mit 0,01 M Phosphatpuffer eluieren
11. Fraktionen von 1 ml sammeln (Vorlage: 0,5 ml 2% BSA-Lösung)

Aus der Verteilung der Radioaktivität in diesen Fraktionen ergibt sich eine Elutionskurve mit zwei Peaks. Der Hauptpeak bedeutet das radioaktiv markierte Hormon, während der zweite Peak - auch Salzpeak genannt - Bruchstücke des Hormons, Verunreinigungen sowie freies radioaktives Jod darstellt.

4.5 Nachreinigung

Herstellen einer Sephadexsäule (G-200)Füllhöhe ca. 30-35 cm. Der Inhalt von zwei bis drei Röhrchen des Peak I der Elution nach der Jodierung werden aufgetragen und mit 0,01 M Phosphatpuffer eluiert (Tropfgeschwindigkeit ca. zwei Tropfen pro Minute). Zur Verminderung der Adsorption an der Glaswand des Auffang-Röhrchens wurde eine Spatelspitze BSA-Pulver vorgegeben. Der Inhalt von vier bis fünf Röhrchen des Peak I der 1. Nachreinigung wurden einer zweiten derartigen Reinigung unterworfen.

4.6 B - O - Bindung

Das radioaktive Hormon wird durch Markierungsprozesse u.a. Einflüsse mehr, denaturiert bzw. immunologisch verändert. Es ist daher sinnvoll, zu überprüfen, wie weit das markierte

Hormon noch funktionsfähig ist. B-O-Bindung ist die Bindung an den Antikörper in Abwesenheit des "kalten" Hormons. Diese Bindung ist konzentrationsabhängig (wie jedes geschlossene chemische Gleichgewicht).

4.7 Messung der Radioaktivität

Erfolgte in einem Gamma-Zähler (Typ Packard Auto Gamma Scintillation Spectrometer Nr. 5160 oder Tracerlab Gamma/guard 150) in der Weise, daß die von einer (meist gelösten) radioaktiven Substanz ausgestrahlten Impulse über einen Zeitraum von 200 sec hinweg registriert und als "counts" gezählt wurden. Die Summe der ständig registrierbaren Strahlen wird als Hintergrund (background) von jedem Meßergebnis der Proben subtrahiert.

4.8 Die Radioimmunassay - Methode (speziell)

Im wesentlichen wurden die vom National Institute of Health/ Bethesda Md., USA gegebenen Richtlinien übernommen.
Die folgenden Schritte wurden der Reihenfolge nach durchgeführt:

1. Plastik-Reagenzröhrchen zum einmaligen Gebrauch wurden als Assayröhrchen verwendet.

2. Diluent (in genügender Menge für ein Gesamtreaktionsvolumen von 800 ul) wurde zugegeben.

3.a) Weiter wurde zugegeben das zu untersuchende Serum (100 bzw. 200 ul) oder
   b) die Standardverdünnung der Reference Präparation von 500 ng bis 2,5 ng in solchen Zwischenstufen, daß eine Standardkurve gezeichnet werden konnte.

4. 200 ul des Antiserums gegen das jeweilig zu messende Hormon in einer Arbeitsverdünnung von 1 : 10 000 bis 1 : 15 000 in mit 3% normalem rabbit Serum versetzten Phosphatpuffer.

5. Dieses Gemisch wurde auf einem Rotamix-Schüttler kurz aufgeschüttelt und 24 h bei 4° C inkubiert.

6. 100 ul jodiertes Hormon in einer Verdünnung von 40 000 counts pro 200 Sekunden dazugegeben.

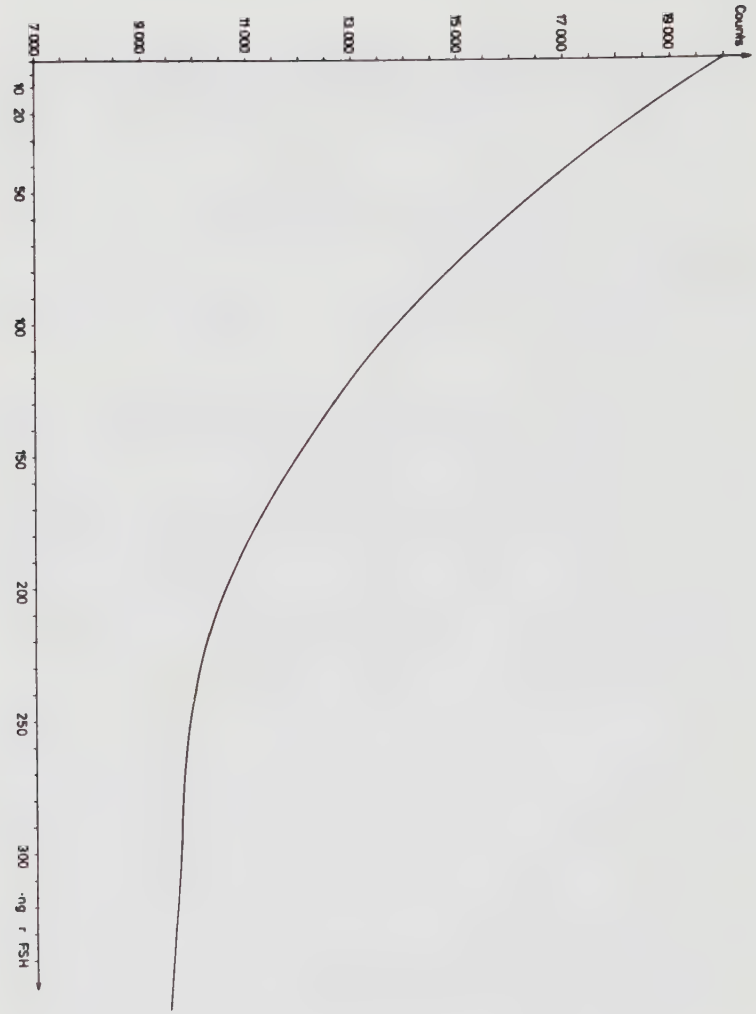
7. Nach kurzem Schütteln des Reaktionsgemisches 24 h bei 4^{o} Celsius inkubiert.

8. Nach dieser Zeit wurden 200 ul genügend (meist 1:12) verdünntes anti-rabbit-gamma-Globulin dazugegeben um die maximale Präzipiation des an den Antikörper gebundenen Hormons zu erreichen. Verdünnung mit 0,01 molarem Phosphatpuffer.

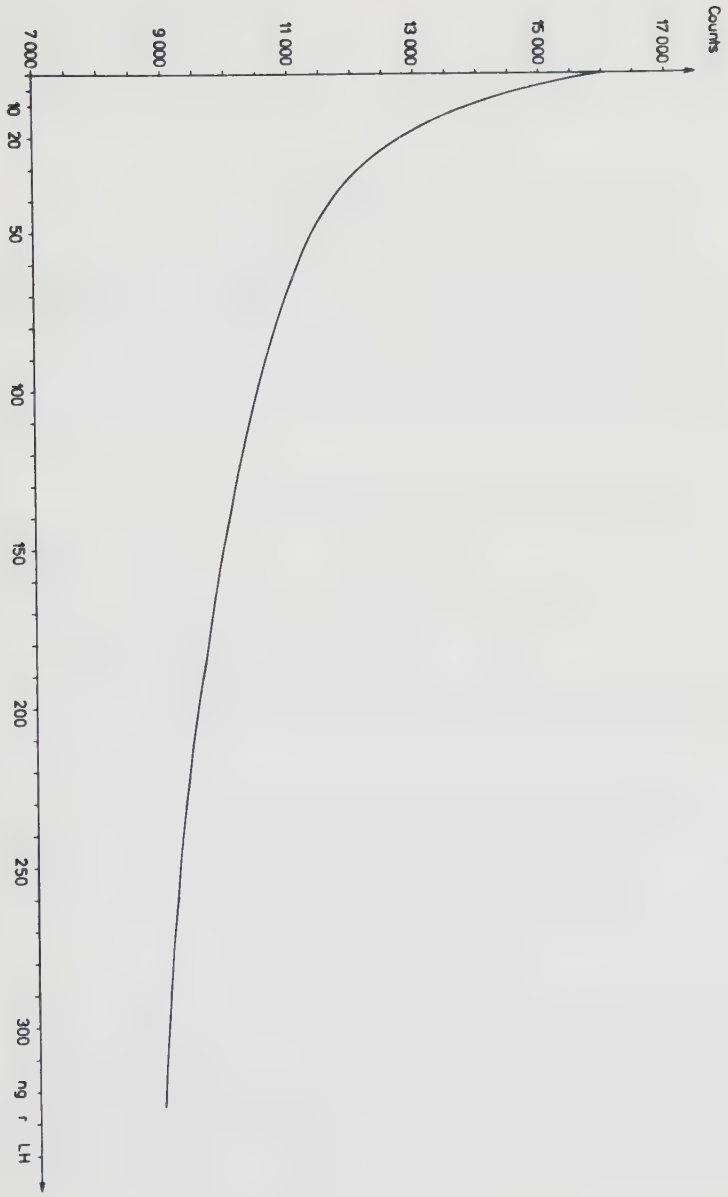
9. Nach kurzem Schütteln des Gemisches wurde 3 Tage bei 4^{o} Celsius inkubiert.

10. Zentrifugation bei 2000 x g für 2 Stunden. Der Überstand wird abgekippt. Das Präzipitat in einem Packard bzw. Tracerlab Gammazähler gezählt.

11. Die Röhrchen mit den unbekannten Mengen des Hormons werden mit den Counts der Standardverdünnung der Reference Präparation verglichen. Dazu wird graphisch eine Kurve dieser Standardwerte konstruiert und die Werte der unbekannten Proben direkt aus dieser Kurve abgelesen oder mittels Lochstreifen im Computer ausgewertet. Die Ergebnisse werden als ng NIAMDD-Rat LH-RP-1 bzw. ng NIAMDD-Rat FSH-RP-1 per ml Serum ausgedrückt.



Kurve der Standards für FSH



Kurve der Standards für LH

5. Ergebnisse

Aus Tabellen und Schaubildern ist leicht abzulesen, daß das Fehlen eines Gliedes im Regelkreis Hypothalamus-Hypophyse-Ovar - in diesem Falle des Ovars - den Hormonspiegel von FSH und LH im Serum verändert. Die Einzelergebnisse sind folgende:

5.1 20 Tage alte Ratten (Vorpubertät)

5.1.1 Serum FSH-Spiegel nach Ovarektomie

Nach Ovarektomie steigt der FSH-Serum-Spiegel von rd. 800 ng/ml innerhalb von 3 Tagen steil an. Er erreicht am 3. Tage einen Gipfel von rd. 2500 ng/ml, (etwas mehr als das Dreifache des Basalwertes), fällt dann in den folgenden Tagen langsam ab auf Werte um 1700 ng/ml (Zweifaches des Basalwertes) am 10. Tag. Der Spiegel stellt sich dann auf diesem Niveau ein. Siehe Abb. I_1

5.1.2 Serum LH-Spiegel nach Ovarektomie

Der Serum-LH-Spiegel bewegt sich vor der Ovarektomie zwischen 60 - 100 ng/ml. Er bleibt am ersten Tag etwa gleich, sinkt am zweiten Tag auf Werte unter 60 ng/ml, steigt am dritten Tag auf 500 - 600 ng/ml an; er erreicht am vierten Tag Werte um 700 ng/ml; diese Werte halten sich über rund 5 Tage und bewegen sich ab dem 7. Tag in Bereichen zwischen 500 und 1000 ng/ml.

5.1.3 Verhältnis FSH zu LH nach Ovarektomie

Die Gonadotropine FSH und LH reagieren, wie wir oben sehen, im Laufe von 10 Tagen nach Entfernung der Ovarien mit einem unterschiedlichen Anstiegsverhalten: die Anstiegsgeschwindigkeit ist bei FSH größer, FSH stellt sich schneller auf die neue Situation ein; die prozentuale Zunahme ist aber beim LH größer. Diese Parameter kommen zur Geltung, wenn man den Quotienten FSH zu LH bildet. Bei den 20 Tage alten Tieren ist das Verhältnis vor der Ovarektomie 10. Weil das FSH nach dem Eingriff bis zum dritten Tag sehr schnell ansteigt, das LH aber zunächst relativ langsam wächst, nimmt der Quotient zu: er ist am zweiten ag nach Ovarektomie 18,7 am

dritten Tag hat das FSH seinen Gipfel erreicht, das LH nimmt prozentual gesehen stark zu, der Quotient sinkt deshalb auf 4,55. Das FSH nimmt jetzt langsam wieder ab, das LH steigt noch an, der Quotient nimmt bis zum 10. Tag auf 2,27 ab.
Siehe Abb. I_3

5.1.4 Gewichtsentwicklung nach Ovarektomie im Gegensatz zu intakten Kontrollgruppen

Weil wir Ratten untersuchten, die sich im Wachstum befinden, beobachteten wir zunächst, wieviel die Tiere pro Tag an Gewicht zunehmen. Es stellte sich heraus, daß Tiere die 20 Tage alt sind, rund 25 g wiegen und jeden Tag etwa 5 g zunehmen. Bei ovarektomierten Rattenweibchen verläuft die Gewichtskurve zu Beginn flacher (Hormonentzug?) um dann 4 Tage nach Ovarektomie einen steilen Anstieg zu machen und ab dem 5. Tag wieder kontinuierlich mit rund 5 g pro Tag anzusteigen.
Siehe Abb. I_4

5.2 35 Tage alte Ratten (Pubertät)

5.2.1 Serum FSH-Spiegel nach Ovarektomie

Im Diöstrus haben pubertäre weibliche Ratten einen Serum FSH-Spiegel von rd. 180 ng/ml. Gleich am 1. Tag nach Ovarektomie steigt der Spiegel auf rd. 1600 ng/ml an (das Zehnfache vom Basalwert). Er sinkt langsam ab und pendelt sich zwischen dem 7. und 10. Tag auf Werte um 1200 ng/ml ein (siebenfaches des Basalwerts).
Siehe Abb. II_1

5.2.2 Serum LH-Spiegel nach Ovarektomie

Die Serum LH-Werte steigen von Werten unter 100 ng/ml am 1. Tag auf 250 ng/ml (2,5 bis 3-faches des Basalwertes) und steigen dann kontinuierlich an bis sie zwischen 7. und 10.Tag sich bei 600 ng/ml einspielen.
Siehe Abb. II_2

5.2.3 Verhältnis FSH zu LH nach Ovarektomie

Bei dieser Altersgruppe ist der Basalwert FSH zu LH 2. Hier erreicht das FSH seinen Gipfel noch schneller als bei präpubertalen Ratten (am 1. Tag nach Ovarektomie), während das LH auch langsam ansteigt. Daher ist der Quotient FSH zu LH am 1. Tag nach Ovarektomie am größten: 6,2. Er erniedrigt sich im Laufe der nächsten Tage zugunsten des LH.
Siehe Abb. II_3

5.2.4 Gewichtsentwicklung nach Ovarektomie im Gegensatz zu intakten Kontrollgruppen

Intakte, 35 Tage alte Ratten nehmen wie die 2o-tägigen Ratten pro Tag 5 g zu. Die ovarektomierten Tiere nehmen hier in den ersten Tagen rund 6 g pro Tag an Gewicht zu. Nach dem 4. Tag rund 8 g pro Tag.
Siehe Abb. II_4

5.3 56 Tage alte Ratten (eben reif geworden)

5.3.1 Serum FSH-Spiegel nach Ovarektomie

Eben der Pubertät entwachsene Ratten von 56 Tagen haben im Diöstrus einen FSH-Spiegel von rund 100 ng/ml. Dieser Wert verachtfacht sich am 1. Tag nach Ovarektomie, steigt bis zum 4. Tag steil an auf Werte um 1500 ng/ml und fällt im Laufe der nächsten 6 Tage langsam auf einen Level von rund 1000 ng/ml (10-faches des Basalwertes).
Siehe Abb. III_1

5.3.2 Serum LH-Spiegel nach Ovarektomie

Von 0 bis 10 ng/ml vor der Ovarektomie ausgehend, verhalten sich die LH-Werte folgendermaßen: Am 1. Tag steigt der Serumgehalt auf rund 100 ng/ml (10-faches des Basalwertes) an, er steigt bis zum 4. Tag schnell auf 300 ng/ml an und dann langsamer, bis er am 7. Tag einen Gipfel von 390 erreicht, um dann langsam wieder abzunehmen. Am 10. Tag haben wir einen Wert von 340 ng/ml re istriert.
Siehe Abb. III_2

5.3.3 Verhältnis von FSH zu LH nach Ovarektomie
Das Verhältnis FSH zu LH ist hier vor der Kastration 20. Beide Gonadotropine erhöhen sich relativ schnell; das LH prozentual betrachtet noch deutlicher als das FSH. Deshalb nimmt der Quotient zunächst auf 8 ab. Wenn dann nach dem 4. postoperativen Tag das FSH wieder zu sinken beginnt, das LH aber immer noch ansteigt, beobachtet man ein erneutes Abfallen dieser Verhältniszahl.
Siehe Abb. III_3

5.3.4 Gewichtsentwicklung nach Ovarektomie im Gegensatz zu intakten Kontrollgruppen

Auch hier wird bei intakten Ratten festgestellt, daß sie 5 g pro Tag an Gewicht zunehmen. Nach Ovarektomie wird hier zum ersten mal eine Gewichtsabnahme beobachtet: von 125 g auf 121 g innerhalb der ersten zwei Tage. Am 3. Tag ist diese Gewichtsabnahme schon wieder ausgeglichen; Die Ratten wiegen sogar rund 132 g. Ab dem 5. Tag kann man eine Gewichtszunahme von etwa 10 bis 14 g pro Tag beobachten.
Siehe Abb. III_4

5.4 90 Tage alten Ratten (Reife)

5.4.1 Serum FSH-Spiegel nach Ovarektomie
Diese fertilen Tiere haben im Diöstrus einen Basalspiegel von rund 100 ng/ml. Nach Ovarektomie steigt der FSH-Spiegel wieder steil an, bis er am 4. Tag einen Peak von 120 ng/ml überschreitet. An den folgenden Tagen stellt sich ein Level von 1000 ng/ml ein (1o-faches des Basalwertes).
Siehe Abb.VI_1

5.4.2 Serum LH-Spiegel nach Ovarektomie
Ausgehend von rund 7 ng/ml stellt man bei der LH-Kurve folgendes fest: langsamer Anstieg in den ersten zwei Tagen auf rund 40 ng/ml (6-faches des Basalwertes), steiler Anstieg bis zum 5. Tag nach dem Eingriff auf 240 bis 250 ng/ml (20-25-faches des Basalwertes); diese Werte werden auch am 7. Tag noch gemessen. Der Wert am 10. Tag lautet 150 ng/ml.
Siehe Abb. IV_2

5.4.3 Verhältnis von FSH zu LH nach Ovarektomie

Wie bei den 56 Tage alten Tieren ist bei den geschlechtsreifen Tieren der Quotient FSH zu LH im Diöstrus 20. Allerdings steigt hier das FSH prozentual und absolut betrachtet zuerst mehr an als das LH, daher erhöht sich der Quotient auf 50. Am 4. Tag, wenn das FSH seinen Gipfel erreicht hat, wächst das LH immer noch. Der Quotient wird wieder kleiner, er sinkt bis 4,0 am 7. Tag post operationem. Weil bei 90 Tage alten Ratten auch der LH-Gipfel innerhalb der 10 Tage nach Ovarektomie überschritten wird, ist der Wert am 10. Tag bei 6,3.

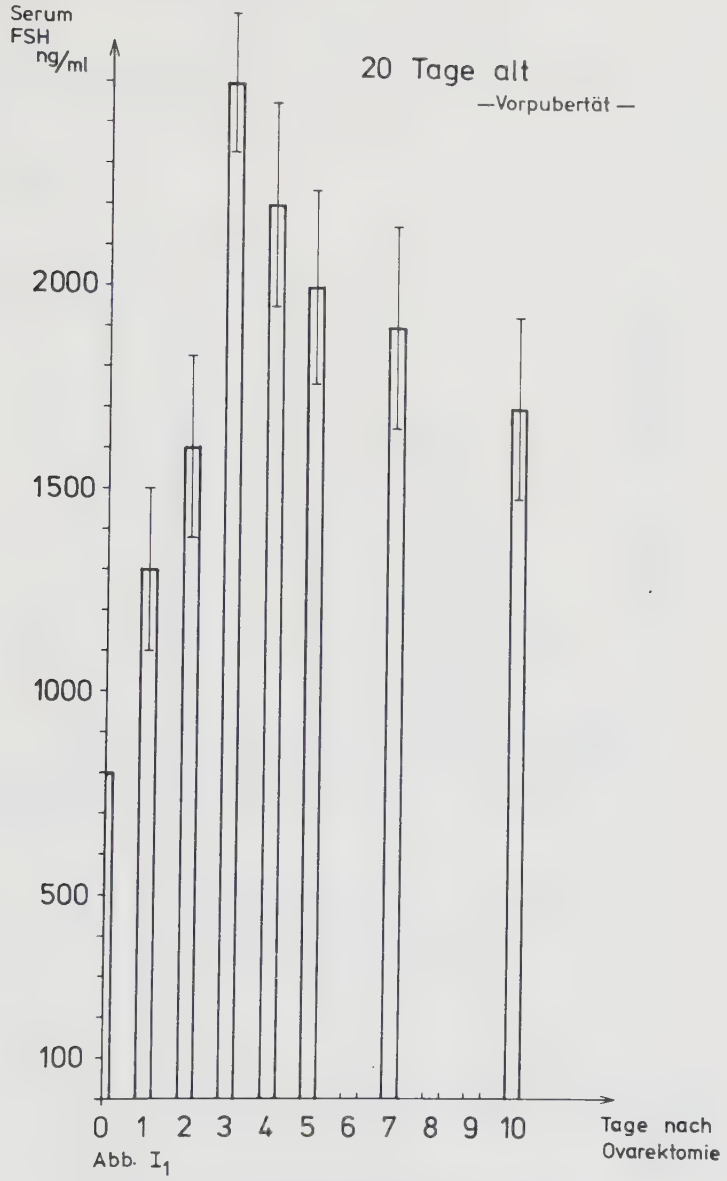
Siehe Abb. IV_3

5.4.4 Gewichtsentwicklung nach Ovarektomie im Gegensatz zu intakten Kontrollgruppen

Die reifen Tiere nehmen im intakten Zustand innerhalb von 10 Tagen etwa 15 g zu (nicht kontinuierlich). Die Gewichtskurve verläuft bei operierten Ratten zwei Tage lang deutlich nach unten: von 180 g auf 156 g. Jetzt steigt die Kurve relativ steil an bis sie am 4./5. Tag Werte um 192 g erreicht (zu diesem Zeitpunkt ist der FSH-Peak erreicht). Von jetzt an ist eine Gewichtskonstanz festzustellen.

Siehe Abb. IV_4 u. Abb. VII

6. Schaubilder



Verlauf des S-FSH nach Ovarektomie - 5.1.1

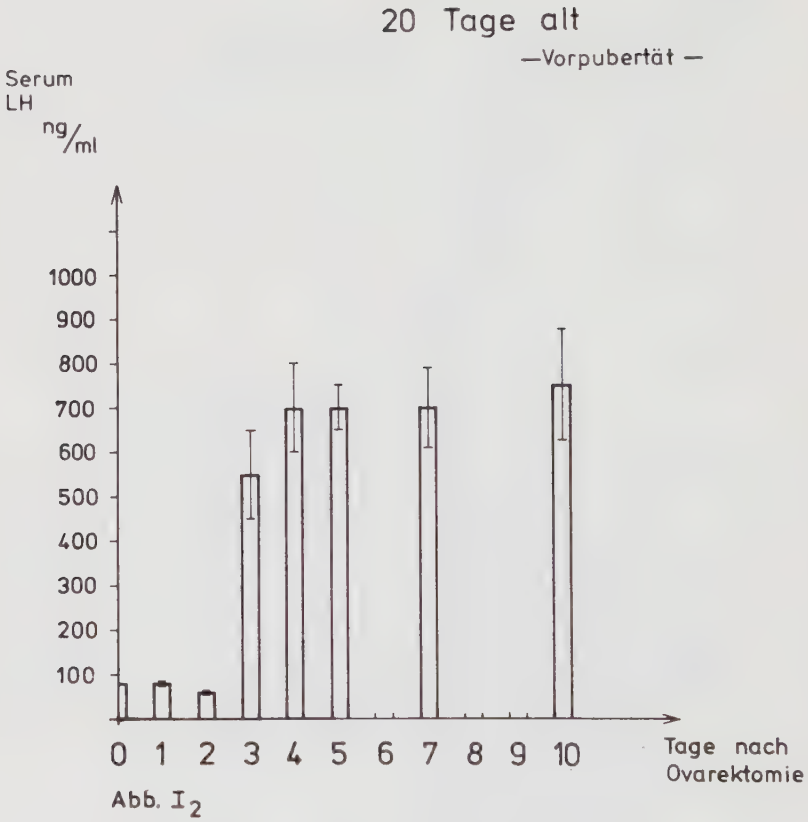


Abb. I_2

Verlauf des S-LH nach Ovarektomie - 5.1.2

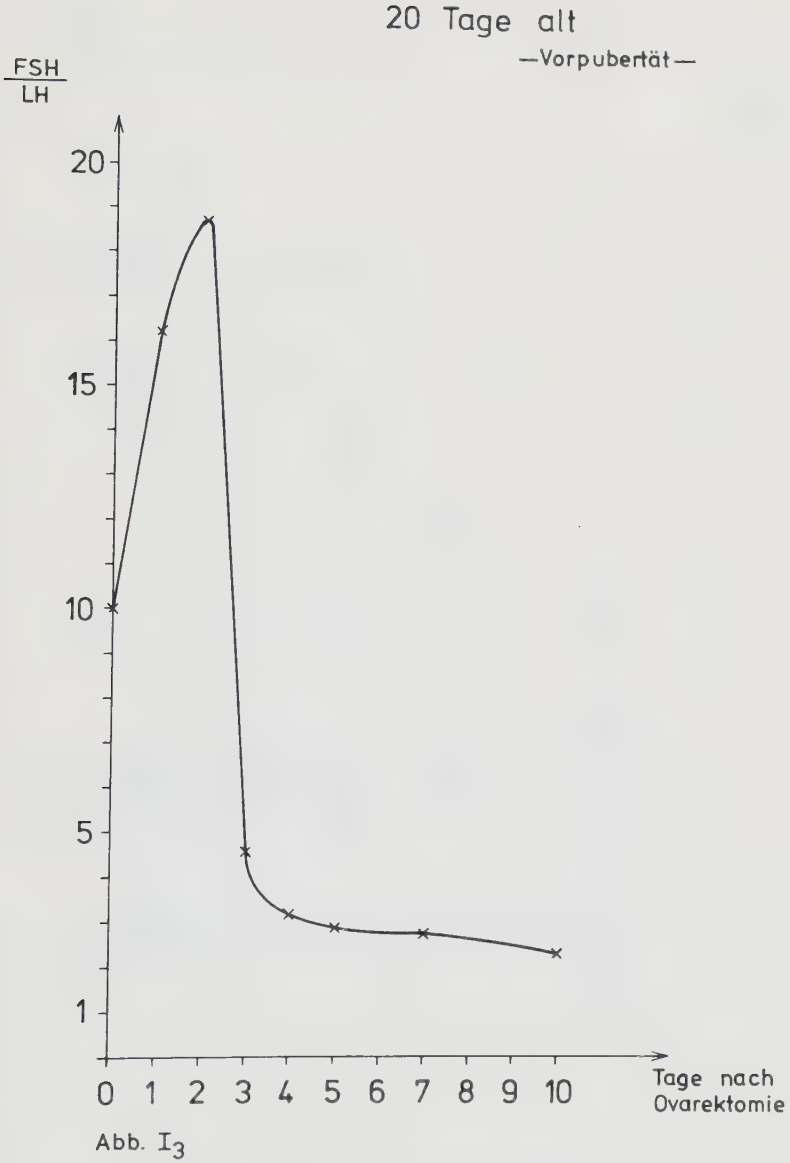


Abb. I_3

Verhältnis FSH/LH nach Ovarektomie - 5.1.3

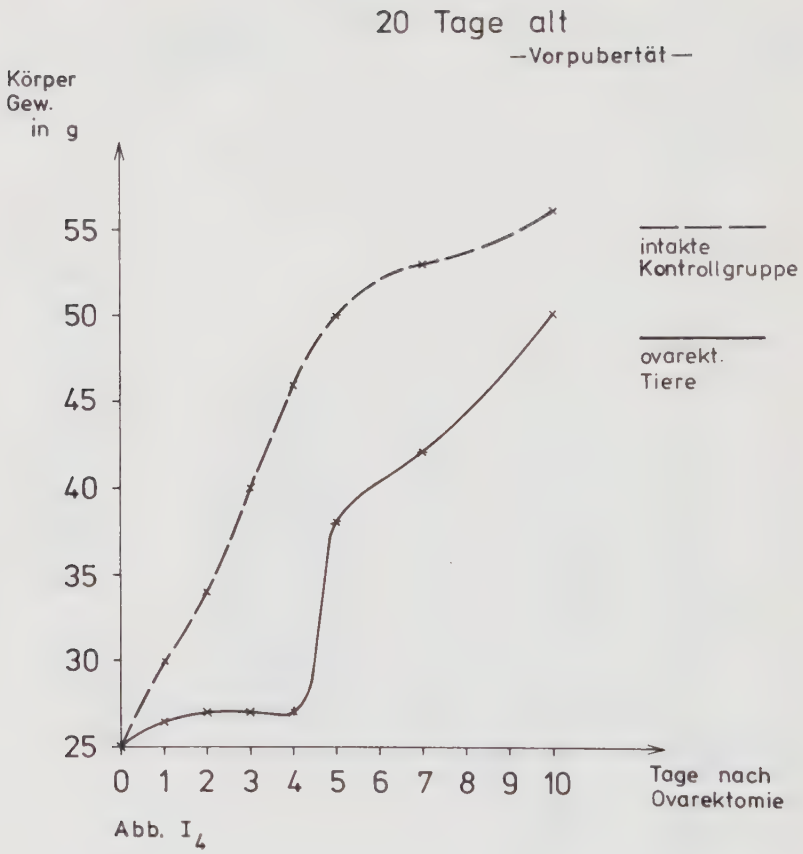


Abb. I_4

Gewichtsentwicklung bei ovarektomierten Tieren im Vergleich zu einer intakten Kontrollgruppe.

- 5.1.4

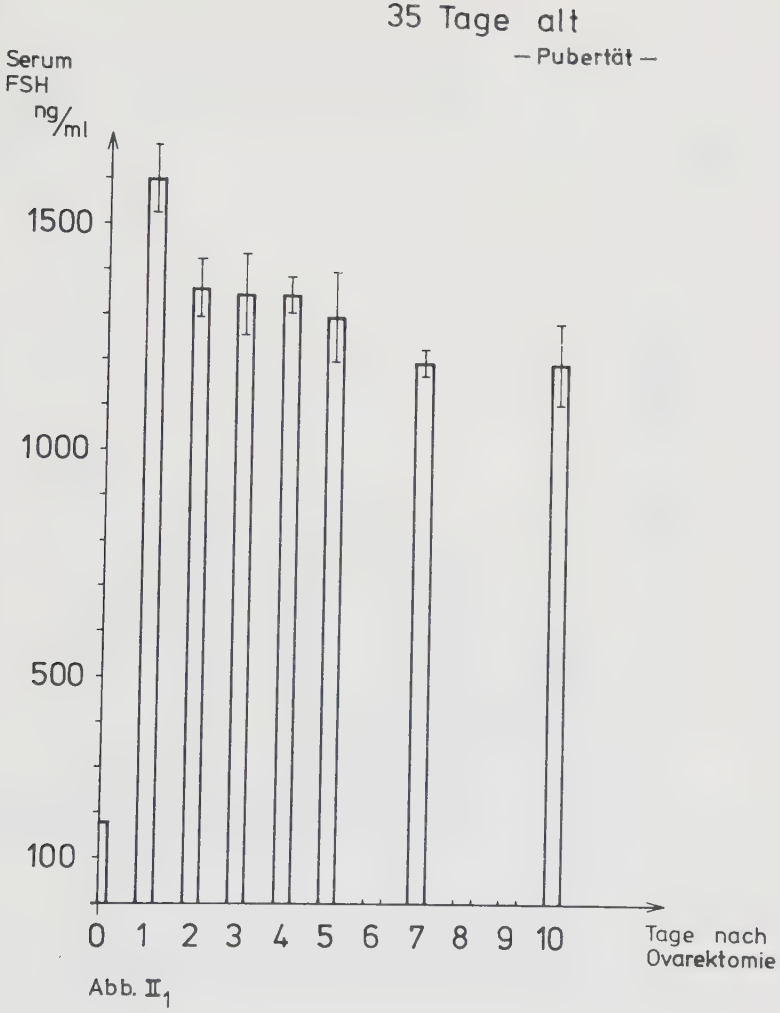


Abb. II$_1$

Verlauf des Serum FSH nach Ovarektomie - 5.2.1

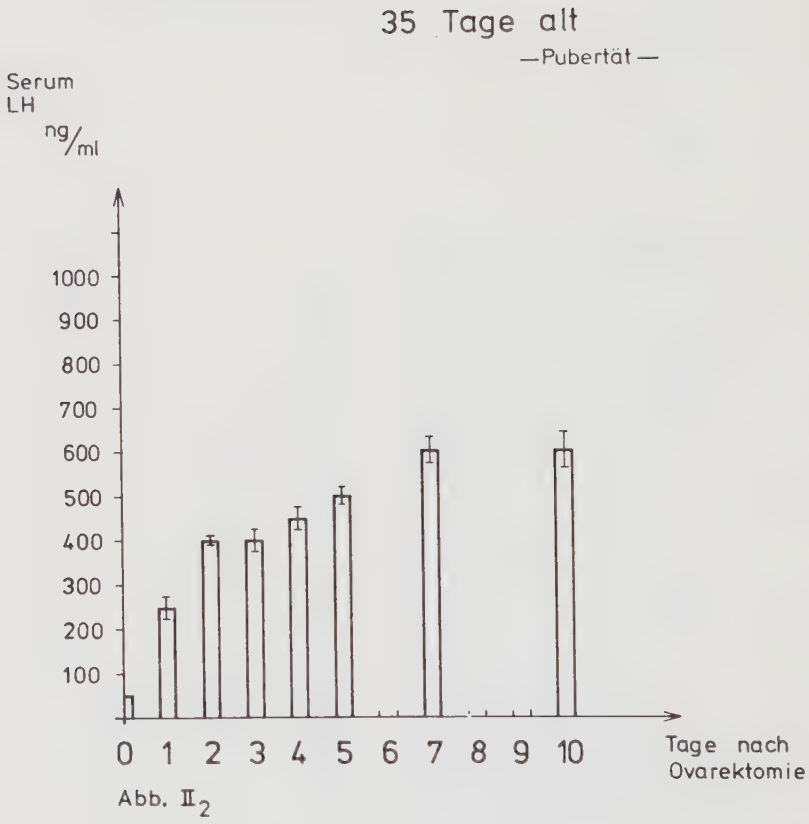


Abb. II$_2$

Verlauf des S-LH nach Ovarektomie - 5.2.2

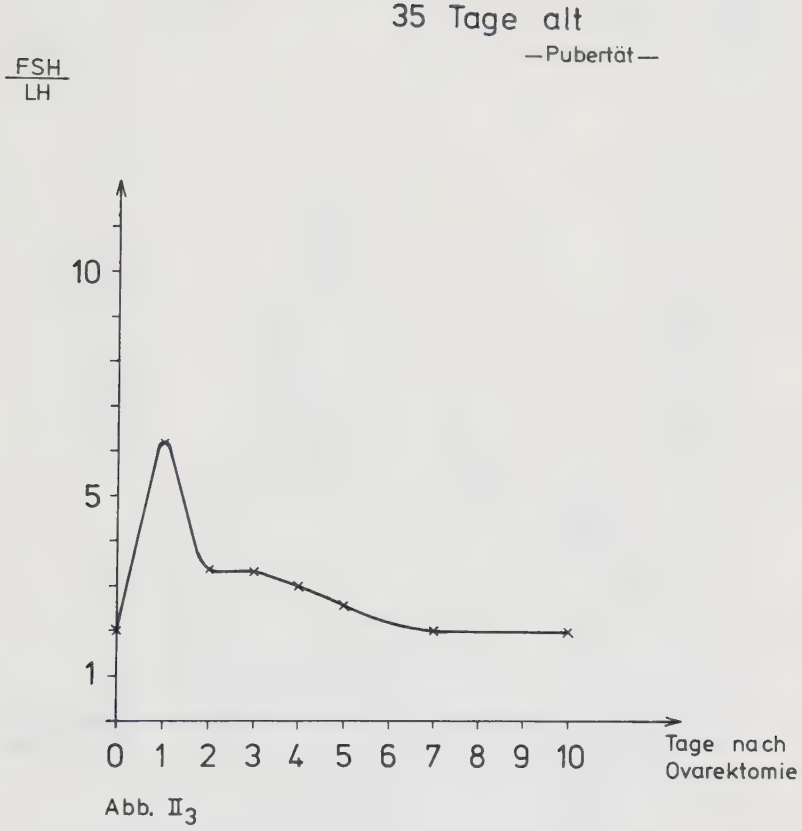


Abb. II$_3$

Verhältnis FSH zu LH nach Ovarektomie - 5.2.3

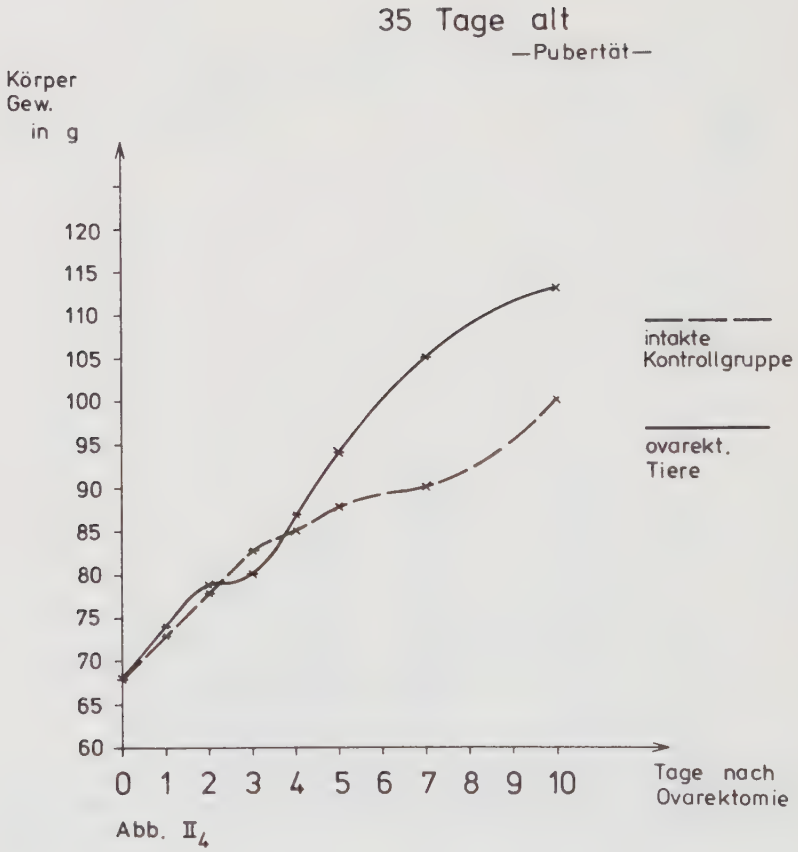


Abb. II_4

Gewichtsentwicklung bei ovarektomierten Tieren im Vergleich zu einer intakten Kontrollgruppe.
- 5.2.4

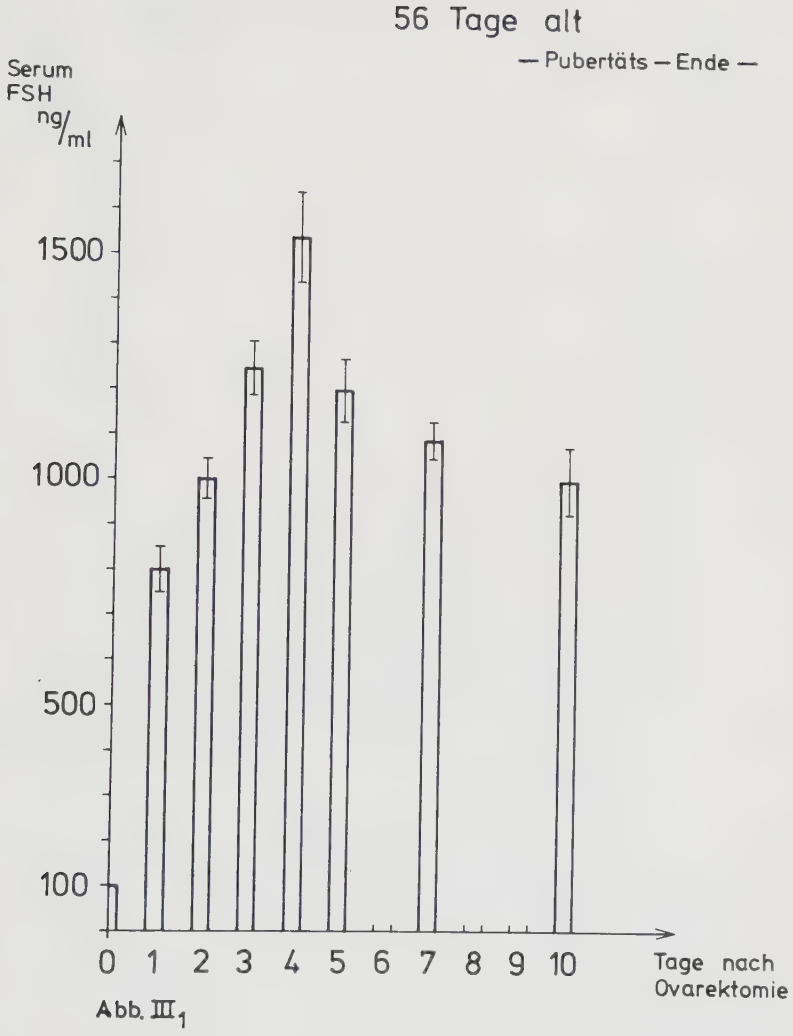


Abb. III$_1$

Verlauf des S-FSH nach Ovarektomie - 5.3.1

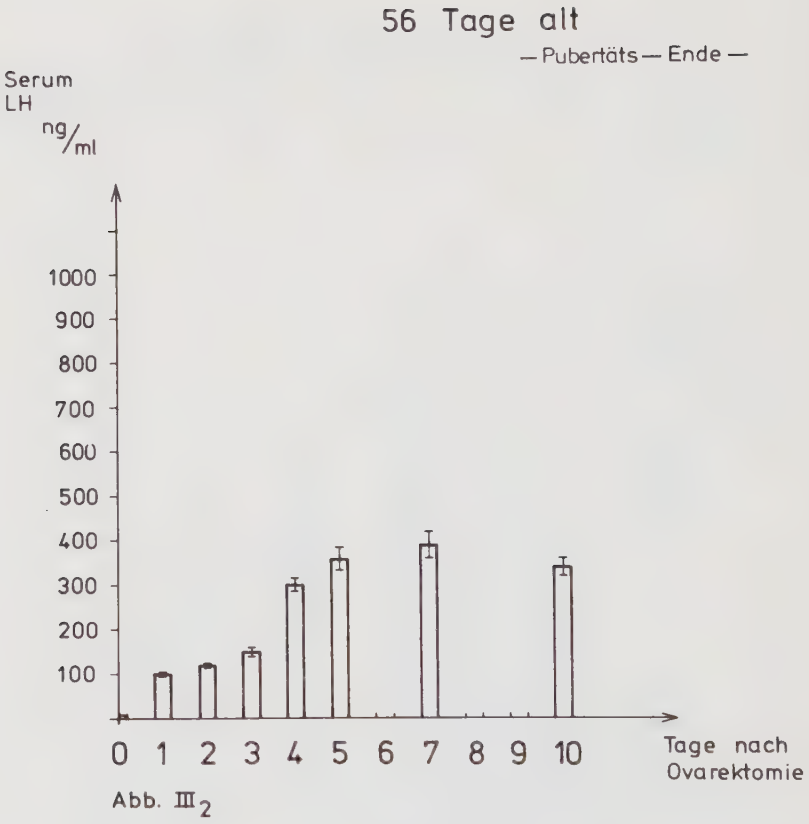


Abb. III$_2$

Verlauf des S-LH nach Ovarektomie - 5.3.2

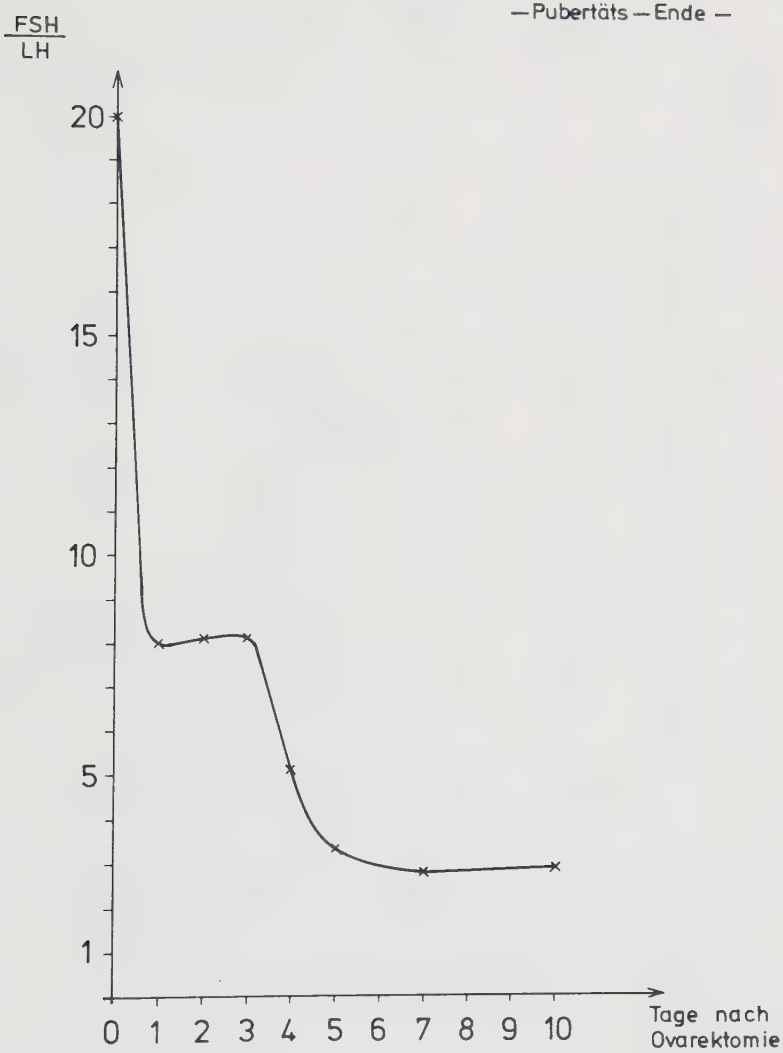


Abb. III$_3$

Verhältnis von FSH zu LH nach Ovarektomie - 5.3.3

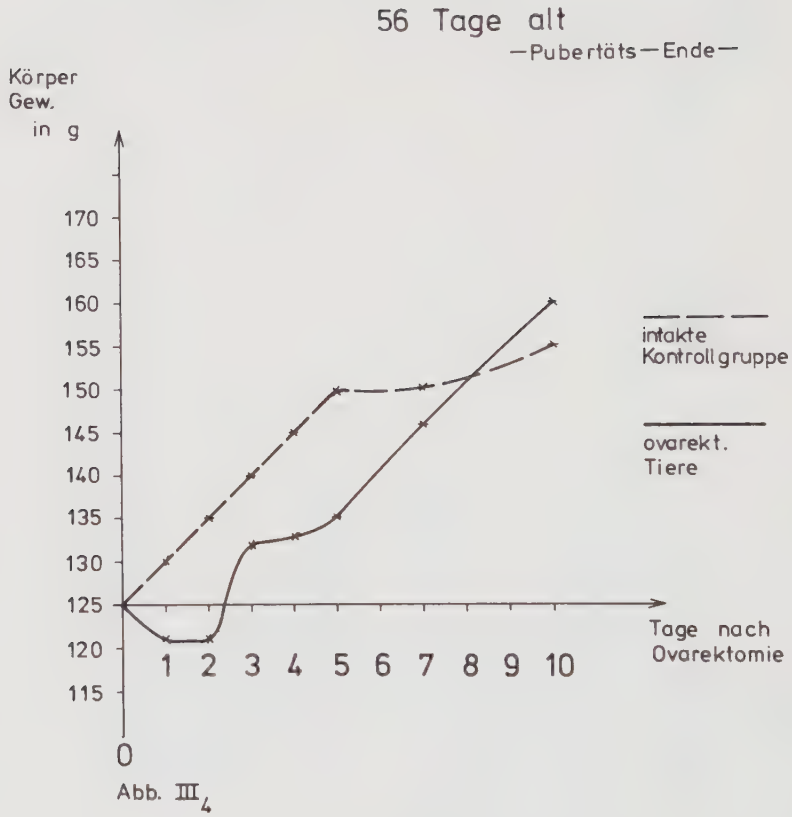


Abb. III$_4$

Gewichtsentwicklung bei ovarektomierten Tieren im Vergleich zu einer intakten Kontrollgruppe - 5.3.4

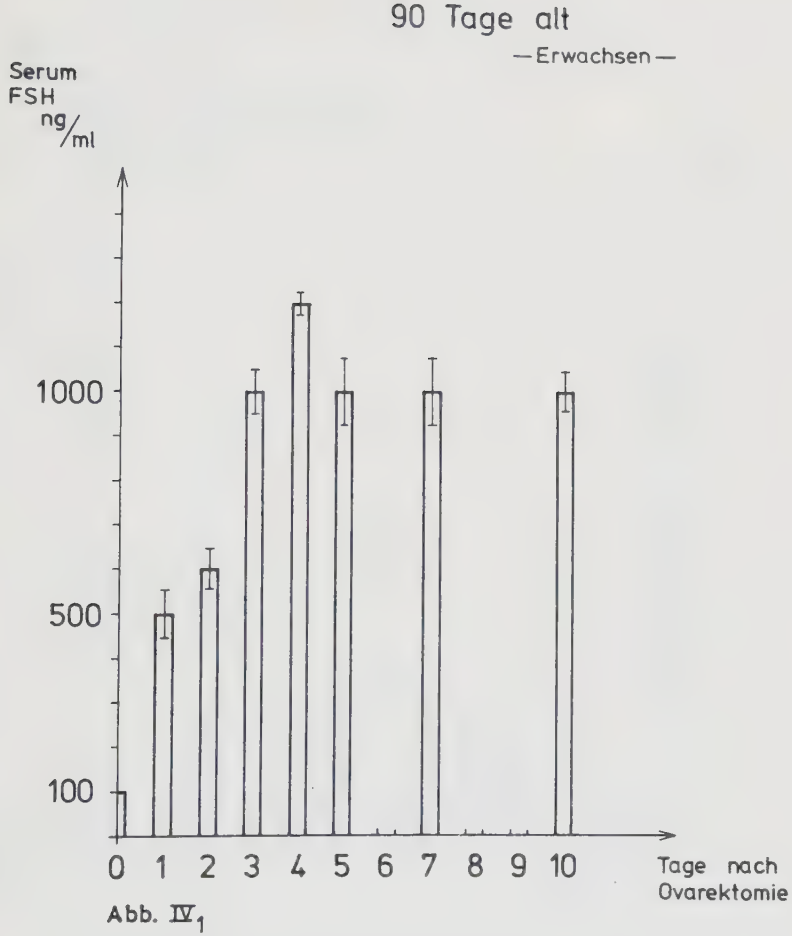


Abb. IV$_1$

Verlauf des S-FSH nach Ovarektomie - 5.4.1

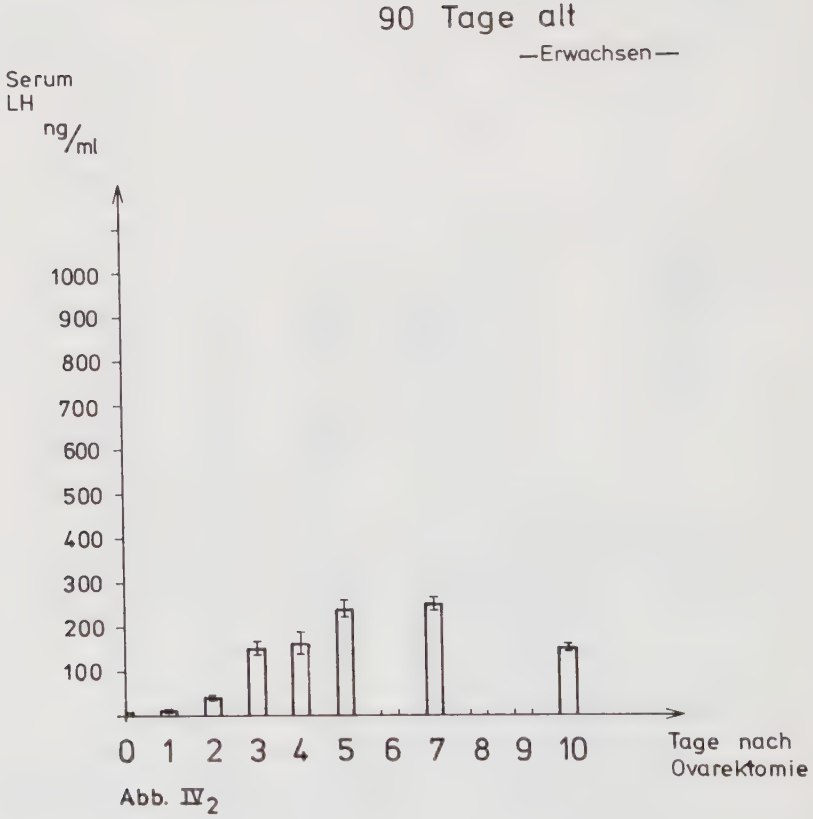


Abb. IV$_2$

Verlauf des S-LH nach Ovarektomie - 5.4.2

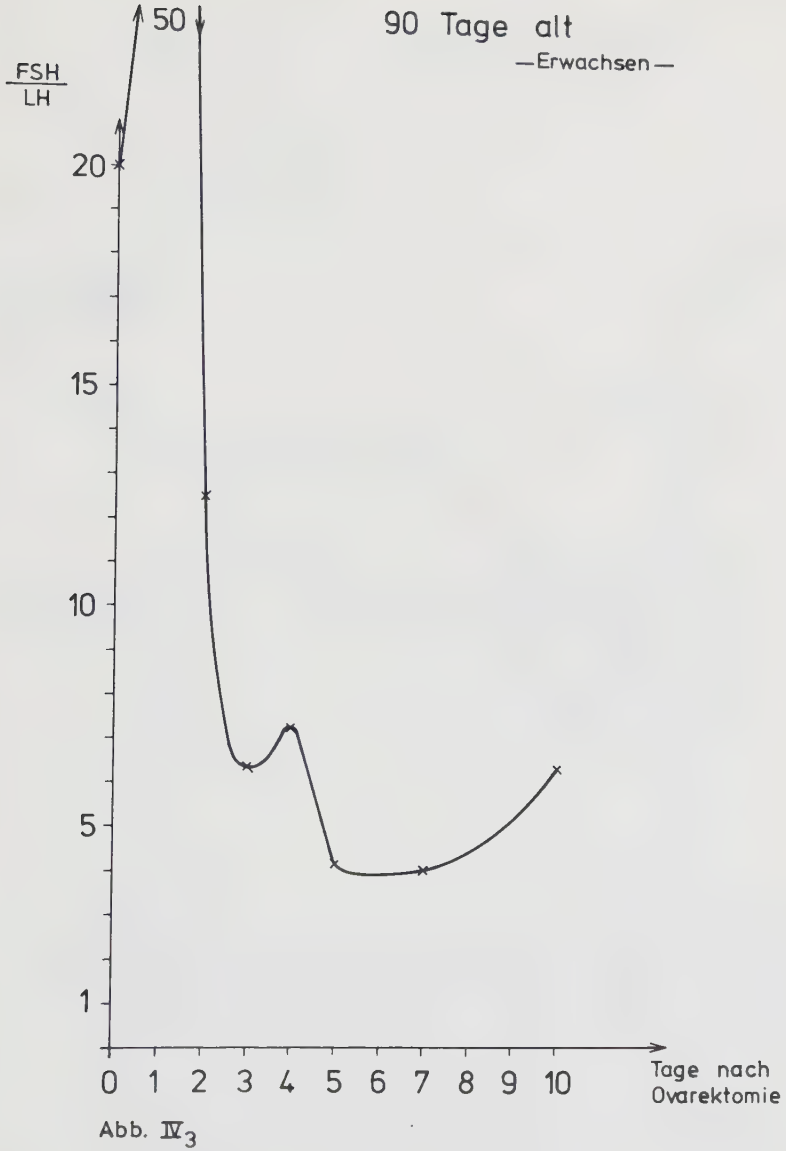


Abb. IV_3

Verhältnis FSH zu LH nach Ovarektomie - 5.4.3

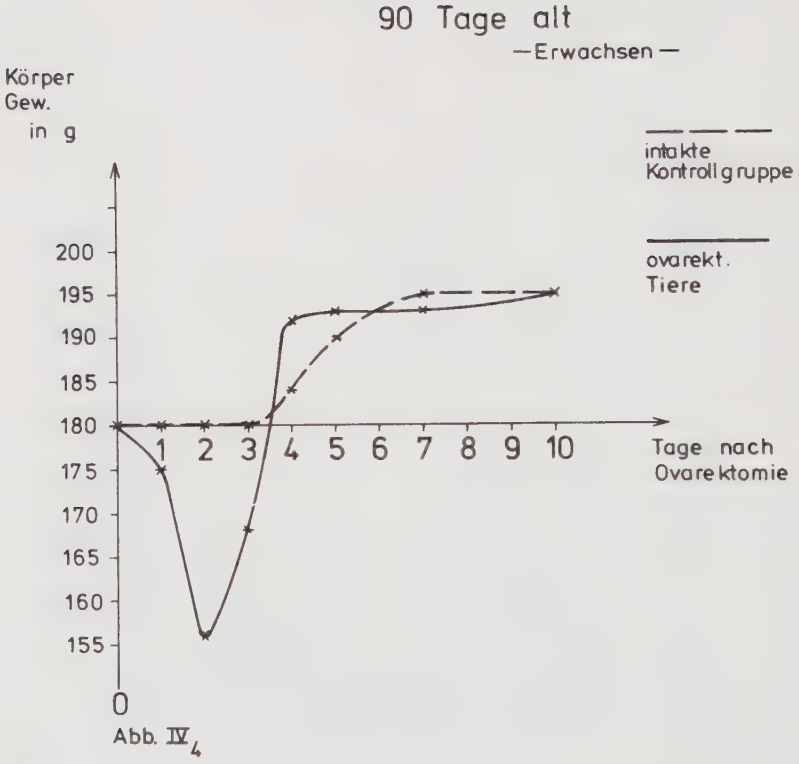


Abb. IV$_4$

Gewichtsentwicklung bei ovarektomierten Tieren im Vergleich zu einer intakten Kontrollgruppe - 5.4.4

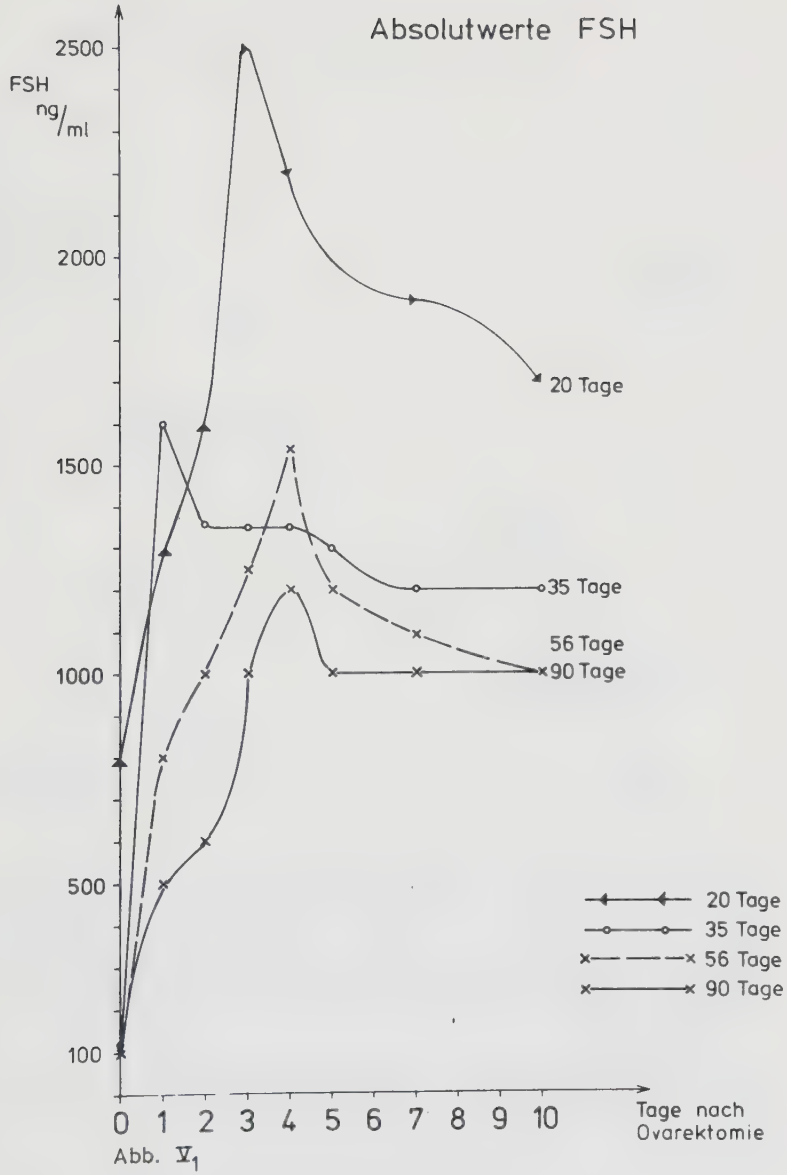

Absolutwerte FSH
FSH
ng/ml
2500
2000
1500
1000
500
100
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Tage nach Ovarektomie
20 Tage
35 Tage
56 Tage
90 Tage
20 Tage
35 Tage
56 Tage
90 Tage

Abb. V$_1$

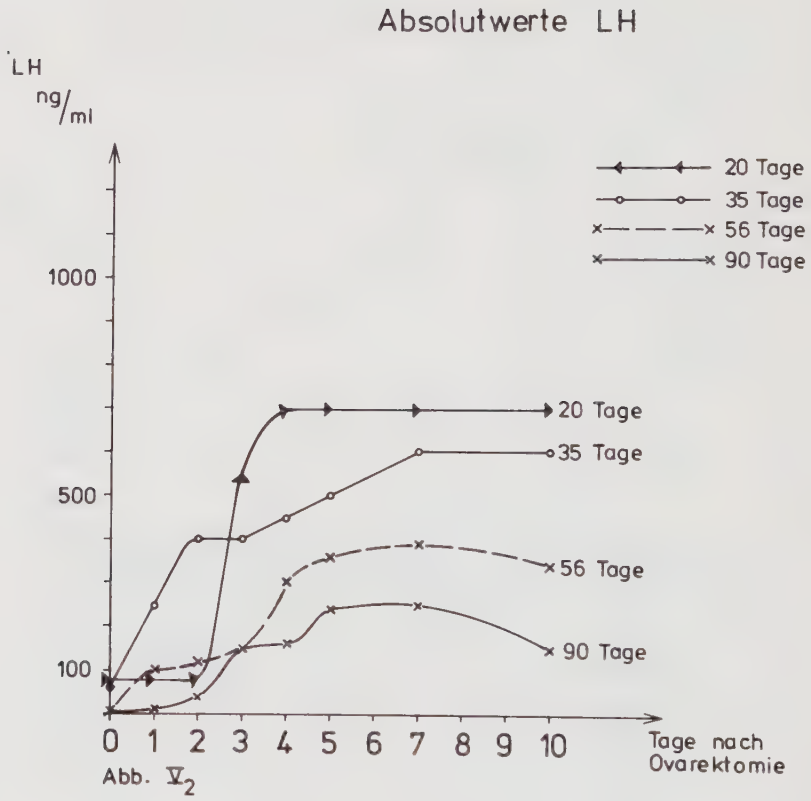


Abb. V_2

Die Abb.V_1 stellt in einem Schaubild den Verlauf des FSH-S-Spiegels innerhalb von 10 Tagen nach Ovarektomie bei allen vier Altersgruppen dar. Man kann hier erkennen, in welch verschiedener Weise die einzelnen Altersgruppen auf den Eingriff reagieren.

Die Abb.V_2 zeigt, die Altersgruppen vergleichend, den Verlauf des S-LH-Spiegels.

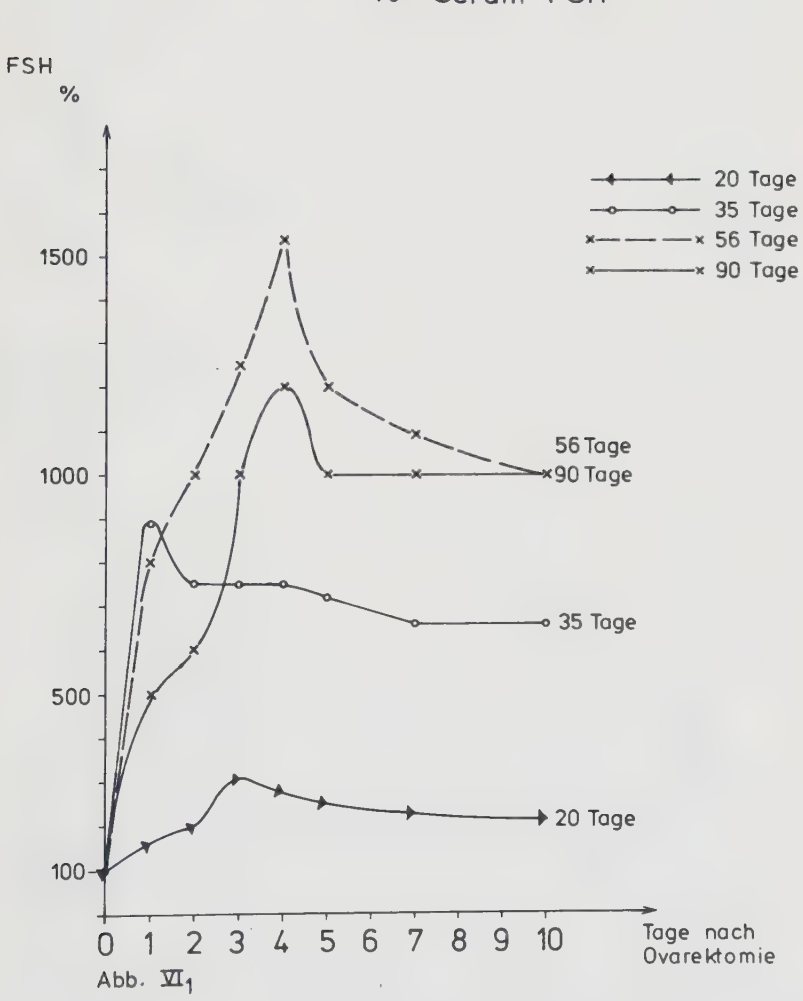

% - Serum FSH
FSH
%
1500
1000
500
100
20 Tage
35 Tage
56 Tage
90 Tage
56 Tage
90 Tage
35 Tage
20 Tage
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Tage nach
Ovarektomie

Abb. VI$_1$

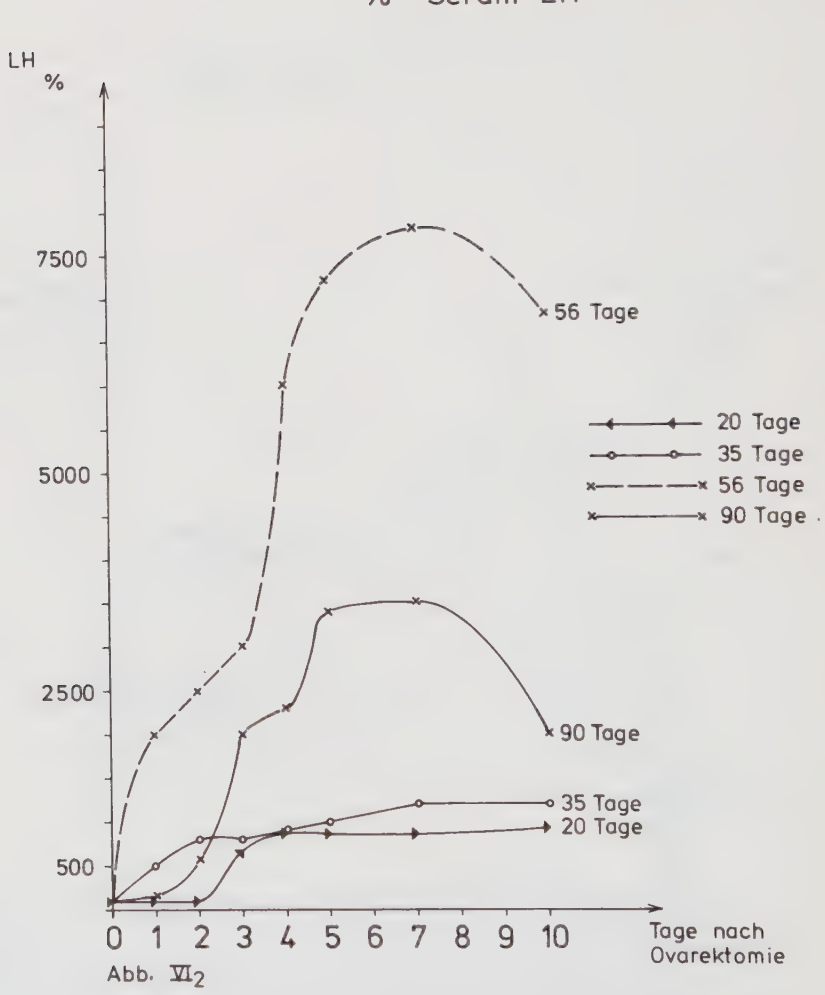


Abb. VI_2

Die Abb. VI_1 zeigt den prozentualen Anstieg von FSH im Laufe von 10 Tagen nach Ovarektomie. Der Anstieg ist für alle vier Altersgruppen aufgezeichnet (Vergleichbarkeit).

Die Abb. VI_2 zeigt de prozentualen Anstieg von LH im Laufe von 10 Tagen nach Ovarektomie. Der Anstieg ist für alle vier Altersgruppen aufgezeichnet (Vergleichbarkeit).

Abb. VII Das Schaubild zeigt die Gewichtszunahme bei 20 Tage, 35 Tage, 56 Tage und 90 Tage alten weiblichen Ratten jeweils in der Zeit von 10 Tagen nach Ovarektomie und die entsprechende intakte Kontrollgruppe in einem Schaubild.

Ergebnisse: 20 Tage alt - vorpubertal -

Tag n. Ov.	S.-FSH ng/ml	Standard-abweichung	S.-LH	Standard-abweichung	FSH/LH	prozentuale Zunahme von FSH	prozentuale Zunahme von LH
0	800		80		10		
1	1300	400	80	10	16,2	160	100
2	1600	450	60	10	18,7	200	100
3	2500	340	550	200	4,55	310	680
	2200	500	700	200	3,15	275	870
5	2000	480	700	100	2,87	250	870
7	1900	500	700	180	2,72	230	870
10	1700	450	750	250	2,27	210	930

Abb.I_1 Abb.I_2 Abb.I_3

Gewicht:

Tage	intakt	ovarektomiert
0	25	25
1	30	26,5
2	34	27
3	40	27
4	46	27
5	50	38
7	53	42
10	56	50

Abb.1_4

Ergebnisse: 35 Tage alt - pubertal -

Tag n. Ov.	S.-FSH ng/ml	Standard-abweichung	S.-LH	Standard-abweichung	FSH/LH	prozentuale Zunahme von FSH	prozentuale Zunahme von LH
0	180		50		2,00		
1	1600	150	250	50	6,20	890	500
2	1360	130	400	20	3,40	756	800
3	1350	180	400	50	3,35	750	800
4	1350	80	450	50	3,00	750	900
5	1300	200	500	40	2,60	720	1000
7	1200	60	600	60	2,00	660	1200
10	1200	180	600	80	2,00	660	1200

Abb.II$_1$ Abb.II$_2$ Abb.II$_3$

Gewicht:

Tage	intakt	ovarektomiert
0	68	68
1	73	74
2	78	79
3	83	80
4	85	87
5	88	94
7	90	105
10	100	113

Abb.II$_4$ Abb.II$_4$

Ergebnisse: 56 Tage alt - eben der Pubertät entwachsen -

Tag n. Ov.	S.-FSH ng/ml	Standard-abweichung	S.-LH	Standard-abweichung	FSH/LH	prozentuale Zunahme von FSH	prozentuale Zunahme von LH
0	100		5		20,00		
1	800	100	100	10	8,00	800	2000
2	1000	90	120	7	8,15	1000	2500
3	1250	120	150	20	8,15	1250	3000
4	1540	200	300	30	5,15	1540	6000
5	1200	140	360	50	3,33	1200	7200
7	1090	80	390	60	2,80	1090	7800
10	1000	150	340	40	2,92	1000	6800

Abb.III$_1$ Abb.III$_2$ Abb.III$_3$

Gewicht:

Tage	intakt	ovarektormiert
0	125	125
1	130	121
2	135	121
3	140	132
4	145	133
5	150	135
7	150	146
10	155	160

Abb.III$_4$ Abb.III$_4$

Ergebnisse: 90 Tage alt - reif -

Tag n. Ov.	S.-FSH ng/ml	Standard-abweichung	S.-LH	Standard-abweichung	FSH/LH	prozentuale Zunahme von FSH	prozentuale Zunahme von LH
0	100		7		20,00		
1	500	110	10	5	50,00	500	150
2	600	90	40	10	12,50	600	570
3	1000	100	150	30	6,32	1000	2000
4	1200	50	160	50	7,25	1200	2300
5	1000	150	240	40	4,15	1000	3400
7	1000	150	250	30	4,00	1000	3500
10	1000	90	150	15	6,30	1000	2000

Abb.IV$_1$ Abb.IV$_2$ Abb.IV$_3$

Gewicht:

Tage	intakt	ovarektomiert
0	180	180
1	180	175
2	180	156
3	180	168
4	184	192
5	190	193
7	195	193
10	195	195

Abb.IV$_4$ Abb.IV$_4$

8. Diskussion und Zusammenfassung

Diese Untersuchung zeigt, wie sich das Entfernen der Ovarien auf den Serumspiegel von FSH und LH bei weiblichen Ratten verschiedenen Alters im Laufe von 10 Tagen auswirkt. Andere Studien haben schon erbracht, daß sich der Hormonhaushalt über ein negative bzw. positives Feedback-System reguliert. (Andrew/Ojeda[1]). Es wurde ebenfalls hinreichend geforscht über die Veränderung dieses Regelsystems im Laufe der sexuellen Entwicklung (Critchlow[3], Döhler/Wuttke[4], Donovan[5], Grumbach[7], Gupta[8], Gupta[11], Steel/Weisz[30,31], Ojeda[21], Labhsetwar[16]). Daß sich der Gonadostat während dieser Entwicklung zu tieferen Werten hin verschiebt, wird in allen Untersuchungen festgestellt. Was die Ursache für diese Neueinstellung ist, darüber ist noch keine einheitliche Meinung zustande gekommen. Diese Theorie ist auch die Erklärung für die Resultate unseres Versuchs. Bei präpubertalen weiblichen Ratten wurden relativ hohe Basalgonadotropinspiegel gemessen (FSH 800 ng/ml, LH 100 ng/ml). Diese Werte nahmen ab, je älter die Ratten wurden: Pubertale Tiere: 120 ng/ml FSH, 60 ng/ml LH; reife Tiere: 100 ng/ml FSH, 5 ng/ml LH. Entsprechend der Höhe der Basalwerte vor dem Eingriff liegen auch die Werte nach Ovarektomie in verschiedenen Höhenbereichen. Allen untersuchten Altersgruppen ist gemeinsam, daß Kastration einen Anstieg der Gonadotropine zur Folge hat. Das spricht wieder für das Vorhandensein eines Regelkreises; in diesem Falle wurde er unterbrochen. H.D. Taubert[27] spricht von einer "Enthemmungsreaktion" als Folge des Östrogenentzugs. Das Serum LH steigt dabei in jedem untersuchten Alter langsamer und weniger drastisch an, als das Serum FSH. Der Mechanismus der die Gonadotropinfreisetzung aus der Adenophypophyse bewirkt, ist noch nicht endgültig geklärt. Vermutlich steht sowohl LH als auch FSH unter der Kontrolle des hypothalamischen RH für Gonadotropine Gn-RH. Weil aber diese beiden Gonadotropine sowohl zeitlich als auch quantitativ unterschiedlich schnell,

bzw. stark ansteigen, wird sogar die Möglichkeit eines spezifischen FSH-RH diskutiert Gupta et al[11], Schalley et al[23-26] Ojeda et al[21]. Ebenso schließen diese Forscher, vor allem Ojeda[21], nicht aus, daß möglicherweise das ovarielle Östradiol direkt auf hypophysere,östradiolspezifische Rezeptoren wirkt und die FSH produzierenden Zellen direkt zu Synthese und Sekretion veranlaßt.
Während der geschlechtlichen Reifung in der Pubertät entwickelt das Ovar seine endgültige Funktionsfähigkeit. Es werden jetzt mehr ovarielle Östrogene produziert. Der bisher hochsensitive Feedback für gonadale Steroide ändert nun auch seinen Sollwert. Das hypothalamisch-hypophysere System reift ebenfalls. Erst bei relativ zum präpubertalen Alter höheren Östradioldosen wird LH-RH aus der Eminentia mediales freigesetzt. Dieses LH/FSH-RH regt die Hypophyse zur FSH und LH-Produktion und Sekretion an (Keller et al[15]). Die obengenannten Autoren fanden, daß sich mit der Reifung des Regelsystems die Stimulierbarkeit von FSH und LH ändert. In der präpubertalen zur postpubertalen Phase nimmt diese Stimulierbarkeit von FSH ab, die von LH zu.
In unserem Versuch konnten wir diese Ergebnisse indirekt bestätigen. Durch Entzug des ovariellen Östradiols wird der Hypothalamus zur LH-RH-Freisetzung und folglich die Hypophyse zur FSH und LH-Sekretion veranlaßt (Analogie zum Clomiphentest) Keller[15]. Das Anstiegsverhalten der beiden Hormone war zeitlich verschieden und altersabhängig.

FSH - Verhalten nach Ovarektomie

Das FSH wird bei allen Altersgruppen schneller erhöht vorgefunden als das LH. Die volle Auswirkung des Eingriffs wird erst einige Tage nach Ovarektomie erreicht. Möglicherweise steigert die Nebennierenrinde kompensatorisch ihre Steroidproduktion und bewirkt dadurch sekundär einen Östrogenanstieg. Die ovariellen Östrogene können dadurch nicht oder nur unvollständig ersetzt werden. Der Gonadostat stellt sich auf einen neuen Östrogenlevel ein. Das FSH bleibt konstant erhöht.

Dieser Vorgang läuft bei prapubertalen Ratten früher und schneller ab, als bei reifen Tieren. Bei diesen jungen Tieren liegt die Schwelle für Östradiol im intakten Zustand höher, das heißt: es ist hier ohne den Eingriff der Ovarektomie nur sehr wenig wirksames Östradiol vorhanden, weil die Gonaden noch nicht funktionstüchtig sind. Wird durch Katration dieses wenige Östradiol entzogen, dann resultiert der rasche Anstieg und Verlauf, den wir in Abbildung I dargestellt sehen. Wie zahlreiche Untersuchungen ergaben, stellt sich in der Pubertät der Gonadostat auf neue niedrigere Sollwerte ein. Wenn man der Theorie von Nunez[20] oder Vanderheyden[33] zustimmt, die beide annehmen, daß die Umstellung nicht im hypothalamisch-hypophyseren Bereich liegt, sondern an das Vorhandensein eines spezifischen östrogenbindenden Alpha-Foetoprotein im fetalen und präpubertalen Alter gebunden ist (Nunez) bzw. daß die MCR = metabolic clearance rate, die im präpubertalen Alter tiefer ist, zu der Umstellung führt (Vanderheyden), dann kann man weiter folgern, daß mit Pubertätsbeginn, wenn die Ovarien langsam funktionstüchtig werden, mehr wirksames Östradiol vorhanden ist, sich der Gonadostat anpaßt. Wird in dieser Situation die Ovarektomie durchgeführt, dann erfolgt ein sehr rascher aber kurz dauernder FSH-peak. Der Gonadostat pendelt sich schnell wieder auf höhere Werte ein (Abb.II_1).

LH-Verhalten nach Ovarektomie

Nach Ovarektomie ergaben sich LH-Kurven mit folgendem Anstiegsverhalten: Die LH-Spiegel steigen an; die älteren Tiere reagieren prozentual gesehen am stärksten bei niedrigsten Basalwerten. Nur bei dieser Altersgruppe ist ein schwacher peak zu erkennen. Dies bestätigt die Beobachtung von Keller[15], der mit der Reifung steigenden LH-Stimulierbarkeit. Die pubertalen Ratten zeigen einen kontinuierlichen Anstieg. Die Werte bleiben ohne peak auf einem relativ hohen Level. Der Anstieg ist in Prozenten ausgedrückt weniger intensiv als bei reifen Tieren, wobei die Basalwerte und die Absolutwerte

höher liegen. Bei den präpubertalen Tieren ist der Anstieg steil. Die Basalwerte und die nach Ovarektomie gemessenen Absolutwerte sind in diesem Alter am höchsten. Ein peak wird nicht überschritten, aber ein neuer Level ist erreicht. Autoren wie Steel[30], Wuttke[34], Ojeda und Andrews[1] u.a. beschreiben ebenfalls, daß für die Gonadotropine LH und FSH nicht dasselbe Feedback-System zuständig ist. Beim LH bewirken definierte Östradioldosen einen positiven Feedback, andere einen negativen Feedback. Diese jeweiligen Östradioldosen sind altersabhängig ebenso wie die Höhe der LH-Basalwerte der intakten Tiere und wie der Kurvenverlauf nach der Ovarektomie altersabhängig sind. Die oben genannten Autoren schlossen daraus, daß der Gonadostat während der Pubertät seine Sensitivität herabsetzt. Diese Erklärung ist für unsere Ergebnisse ebenfalls zutreffend.

Quotient FSH zu LH

Am Verhältnis FSH zu LH kann man auf einen Blick ersehen, daß die Stimulierbarkeit der beiden Gonadotropine nicht einheitlich ist. Das FSH wird, wie schon auf Seiten 18,20,21 u. 22 erwähnt, stärker und schneller über Östradiol/LH-RH beeinflußt als LH. Da wir zehn Tage lang nach Ovarektomie beobachteten, konnten wir feststellen, daß der Quotient in den ersten Tagen nach dem Eingriff bei allen Altersgruppen sehr hoch ist, aber zwischen drittem und fünftem Tag abfällt, also zu Gunsten des LH verschoben wird. Die Höhe der Quotienten ist vom Reifestadium (Alter) abhängig. Die ältesten Ratten erreichen die höchsten Werte, bei ihnen ist aber auch die Differenz der Quotienten im Laufe der zehn Tage am größten. Diese Art der Beschreibung des Gonadotropinspiegels ist wiederum die Bestätigung des heranreifenden Regelsystems in der Pubertät.

Weil wir in einer weiteren Studie Untersuchungen über die Möglichkeit der exogenen Östradiolsubstitution machen wollen, war diese ausgedehnte Pilot-study notwendig. Die Östradiolsubstitution soll nämlich dann erfolgen, wenn der FSH-Spiegel

nach dem Eingriff am höchsten ist. Wir wählen den FSH-Gipfel, weil FSH mengenmäßig das gewichtigere Gonadotropin ist und Östrogene über LH-RH bzw. direkt stärker die FSH-Ausschüttung hemmen als die LH-Ausschüttung (Taubert[27]).

Gewichtsentwicklung nach Ovarektomie

Da Östrogene durch Wasserretention zu Gewichtszunahme führt, ist nach Ovarektomie eine Gewichtsabnahme zu erwarten. (vgl. Neugeborene). Wir haben bei unseren Tieren sowie bei je einer scheinoperierten Kontrollgruppe zehn Tage lang das Gewicht kontrolliert, um diese Vermutung zu prüfen. Tatsächlich verlieren die 90 und die 56 Tage alten Tiere anfangs an Gewicht. Dann erfolgt eine sehr rasche Gewichtszunahme. Dieser plötzliche Wiederanstieg des Gewichts fällt mit dem Überschreiten des FSH-peak zusammen und ist vermutlich die Folge der kompensatorischen Produktion von NNR-Steroiden und folglich Östrogenen. Nach dieser vermehrten NNR-Steroid-Produktion stellt sich der FSH-Spiegel wie oben beschrieben wieder auf einen neuen Level im Regelsystem ein. Ebenso bleibt jetzt die Gewichtszunahme wieder in Bereichen, wie intakte Tiere sie zeigen. Die pubertalen Tiere nehmen nach der Ovarektomie nicht an Gewicht ab. Die Gewichtszunahme ist sogar größer, als bei der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis ist völlig überraschend. Die Erklärung mag ein vor der Pubertät angelegter Gewichtsschub sein. Wenn die Vermutung stimmt, daß die Adrenarch vor der Menarch stattfindet und den Körper auf die verändernden Vorgäng in der Pubertät vorbereitet, dann ist die Adrenarch der Faktor, der diesen Gewichtsschub einleitet. Keller et al[15] haben beschrieben, daß die Adrenarch bei Mädchen die Voraussetzung für das Einsetzen der Pubertät ist. Die Adrenarch führt durch das Einsetzen der NNR-Steroid-Produktion zu einer Gewichtszunahme und zur Entwicklung der sekundären Geschlechtsmerkmale. Die hauptsächliche Erklärung dürfte jedoch das Vorhandensein des Wachstumshormons sein. Das Wachstumshormon wird ebenfalls über die hypothalamisch-hypophysere Achse regu'iert. Der Hypothalamus setzt GH-RH bzw. GH-RIH frei. Es hat einen Basalspiegel, der in allen

Altersgruppen etwa gleich hoch ist. Ein auf verschiedene Stimuli wie: Bewegung, Essen, Glykogen-Spiegel, Insulinspiegel, Streß, erhöhter GH-Spiegel, ist für den Wachstumsschub in der Pubertät hauptverantwortlich (Gupta[11]). GH soll nach Meinung vieler Forscher der empfindlichste Parameter in Bezug auf Störanfälligkeit des hypothalamisch-hypophyseren Systems sein. In der Pubertät erfährt dieses System eine starke Veränderung im Sinne von Reifung und Differenzierung. Es reagiert in dieser Zeit besonders stark auf jede Irritation. Ovarektomie ist ein zusätzlicher Streß. Dadurch steigt das GH an. Möglicherweise reagiert auch die NNR in der Pubertät schneller mit einer kompensatorischen Mehrproduktion von Steroiden und folglich Östrogenen als bei präpubertalen und reifen Tieren, eben weil das Regelsystem empfindlicher auf Störeinflüsse reagiert. Die präpubertalen Ratten nehmen unbehandelt kontinuierlich stark zu. Östradiolentzug durch Kastration bewirkt eine über vier Tage dauernde Gewichtskonstanz, was einer Gewichtsabnahme bei reifen Tieren entspricht. Wie bei den reifen Tieren erfolgt mit dem FSH-peak ein starker Gewichtsanstieg, der wieder zu gleichmäßiger Gewichtszunahme, ähnlich dem intakter Tiere, übergeht. Die Begründung sehen wir, wie bei den anderen Altersgruppen, im plötzlichen Anstieg der kompensatorischen NNR-Steroid-Produktion und am Anstieg des Wachstumshormons durch Streß. Untersuchungen über das Verhalten des Gewichts nach Ovarektomie sind uns nicht bekannt. Unsere Nebenbeobachtungen im Rahmen der Pilot-study könnten Anlaß zu weiteren Untersuchungen über den Zusammenhang Pubertät/Gonadenhormone/NNR Hormone/Wachstumshormone/körperliche Entwicklung sein.

9. Literaturverzeichnis

1) ANDREWS, W.W., OJEDA, S.R.:
On the Feedback-Actions of Estrogen on Gonadotropin and Prolactin Release in Infantile female Rats

Endocrinology 101: 1517 (1977)

2) ANDREWS, W.W., OJEDA, S.R.:
Activation of Estrous Behavior in Ovariektomized Rats by intracerebral Implants of Estradiol Benzoate

Endocrinology 101: 1717 (1977)

3) CRITCHLOW, V. and BAR-SELA, M.W., in:
Eds.: Martini, L. and Ganong, W.F.
Control of the Onset of Puberty

Neuroendocrinology vol II, Academic Press, New York 1967, p. 101

4) DÖHLER, K.D., WUTTKE, W.:
Changes with Age in Levels of Serum Gonadotropins, Prolactin and Gonadal Steroids in Prepuberal Male and Female Rats

Endocrinology 97: 898 (1972)

5) DONOVAN, B.R., VAN DER WERFF TEN BOSCH, J.J.:
The hypothalamus and sexual maturation in the rat

J.Physiol. 147: 78 (1959)

6) GRUMBACH, M.M., in:
Control of onset of Puberty
Eds.: Grumbach, M.M., G.D. Grave and F.E. Mayer,

Wiley & Sons, New York (1974)

7) GUPTA, D., EICHNER, M.:
Interaction of gonadal steroids, gonadotropins and gonadotropin releasing Hormons in sexual maturation

Journal of Steroid Biochemistry, Vol. 11
579: (1979)

8) GUPTA, D., in:
Hypothalamic Hormones - Structure, Synthesis and Biological Activity
Eds.: D. Gupta and W. Voelter,

Verlag Chemie, Weinheim (1975)

9) GUPTA, D., in:
Hypothalamic Hormones - Chemistry, Physiology and Clinical Applications
Eds.: D. Gupta and W. Voelter
Verlag Chemie, Weinheim (1978)

10) GUPTA, D., in:
Aktuelle Probleme der pädiatrischen Endocrinologie
Eds.: W. Swobod und H. Zimprich
Springer Verlag, New York (1977)

11) GUPTA, D., ROHR, M. und EICHNER, M., in:
Hormone im Kindesalter
Eds.: Gupta D.
Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, S. 1 ff (1980)

12) GOLDBERG, R.L., VAITUKAITIS, J.L. and ROOS, G.T.:
Estrogen and Follicle Stimulating Hormone, Interactions on Follicle Growth in Rats
Endocrinology 90: 1492 (1972)

13) HARRIS, G.W.:
Neural Control of the Pituitary Gland
Arnold, London (1955)

14) HOHLWEG, W., JUNKMANN, K.:
Die hormonal-nervöse Regulierung der Funktion des Hypophysenvorderlappens
Klin. Wochenschr. 11: 321 (1932)

15) KELLER, E., FRIEDRICH, E. und SCHINDLER, A.E., in:
Hormone im Kindesalter
Ed.: Gupta, D.
Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, S. 158 ff. (1980)

16) LABHSETWAR, A.P.:
Age-Dependent Changes in the pituitary-Gonadal Relationship
J. Reprod. Fert. 20: 21 - 28 (1969)

17) MERK, F.B., BOTTICELLI, C.R. and ALBRIGHT, J.R.:
An Intercellular Response to Estrogen by Granulosa Cells in the Rat Ovary; an Electron Microscope Study
Endocrinology 90: 992 (1972)

18) NEGRO-VILAR, A., OJEDA, S.R. and Mc CANN, S.M.:
Evidence for Changes in Sensitivity to Testosterone Negative Feedback on Gonadotropin Release during Sexual Development in the Male Rat

Endocrinology 93: 729 (1973)

19) NEILL, J.D., SMITH, M.S.:
Pituitary-Ovarian Interrelationships

Fed.Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 32: 307 (1973)

20) NUNEZ, E.F., ENGELMANN, C., BENASSAYAG, L., u.a.:
Identification et purification préliminaire de la foetoprotéine liant les oestrogènes dans le sérum de rats nouveau-nés

C.R. Acad. Sci (Paris) 273: 831 (1971)

21) OJEDA, S.R., WHEATON, J.E., JAMESON, H.E. and Mc CANN, S.M.:
The Onset of Puberty in the Female Rat: Changes in Plasma Prolactin, Gonadotropins, Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH), and Hypothalamic LHRH Content

Endocrinology 98: 630 (1976)

22) SCHALLY, A.V., BOWERS, C.Y., WHITE, W.F. and COHEN,A.I.:
Purification and in vivo and vitro studies with porcine luteinizing hormones - releasing factor

Endocrinology 81: 77 (1967)

23) SCHALLY, A.V., SAITO, R., ARIMURA, A., SAWANO, S., BOWERS, C.Y., WHITE, W.F. and COHEN, A.I.:
Purification and in vitro and in vivo studies with porcine hypothalamic follicle - stimulating hormone - releasing factor

Endocrinology 81: 882 (1967)

24) SCHALLY, A.V., MÜLLER, E.E. and SAWANO, S.:
Effect of porcine growth hormone - Releasing factor on the release of synthesis of growth hormone in vitro

Endocrinology 82: 271 (1968)

25) SCHALLY, A.V., ARIMURA, S., BOWERS, C.Y., KASTIN, A.J., SAWANO, S. and REDDING, R.W.:
Hypothalamic neurohormones regulation anterior pituitry function

Recent P ogr. Hormone Res. 24: 497 (1968)

26) SCHALLY, A.V., ARIMURA, A., BOWERS, C.Y., WAKABAYSHI,I., KASTIN, A.J., REDDING, T.W., MITTLER, J.C., NAIR,R.M.G., PIZZOLATO, P. and SEGAL, A.J.:
Purification of hypothalamic releasing hormones of human origin

J.Clin. Endocrin. 31: 291 (1970)

27) TAUBERT, H.-D., in:
Gynäkologie und Geburtshilfe
Ed.: Schmidt-Matthiesen,H.

Schattauer Verlag, Stuttgart - New-York (1976)

28) SMITH, E.A., DAVIDSON, J.M.:

Amer.J. Physiol. 212: 1385 (1967)

29) SWERDLOFF, R.S., WALSCH, P.C., and ODELL, W.D.:

Steroids 20: 13 (1972)

30) STEELE, R.W., WEISZ, J.:
Changes in Sensitivity of the Estradiol - LH Feedback System with Puberty in the Female Rat

Endocrinology 95: 513 (1974)

31) STEELE, R.E.:
Role of the Ovaries in Maturation of the Estradiol LH negative Feedback-System of Pubertal Rat

Endocrinology 101: 587, (1977)

32) TURNER, J.W. jr.:
Effect of Hypothalamic Lesions and Androgen on Plasma LH Levels in Castrated Male Gerbils.

Endocrinology 92: 227 (1973)

33) VANDERHEYDEN, J., HOET, J.J., De HERTOGH, EKKA, R.E.:
Metabolic Clearance Rates and the Interconversions Factors of Estrone and Estradiol-17ß in the Immature and Adult Female Rat

Endocrinology 87: 874 (1970)

34) WUTTKE, W.:
Positiv Feedback-Action of Estradiol on Gonadotropin release in 15 days old female rats

Acta endocrinologica 86: 263 - 272 (1977)

35) YEN, S.C., JAFFE, R.B.:
The Human Menstrual Cycle

Reproductive Endocrinology
Holt-Saunders (1978)

LEBENSLAUF

Am 8. April 1955 wurde ich, Roseline Hipp, als Tochter des Karl Hipp und seiner Ehefrau Marianne geb. Nadler in Sigmaringen geboren.

Von 1962 - 1966 besuchte ich die Grundschule in Ringingen/Zollernalbkreis.Von 1966 - 1968 war ich in Rottenburg a.N. im Internat an der Realschule St. Klara.Ich wechselte dann auf das Staatl. Gymnasium in Hechingen.Dort legte ich im Juni 1974 die Reifeprüfung ab.

Ab Oktober 1974 studierte ich in Tübingen Philosophie, Kunstgeschichte und Psychologie.

Im März 1976 begann ich mein Medizinstudium, ebenfalls in Tübingen.Die ärztliche Vorprüfung legte ich im März 1978 und das 1. Staatsexamen im März 1979 ab.

Unter Anleitung von Herrn Professor Dr. D. Gupta begann ich im Sommersemester 1979 an der Kinderklinik der Universität Tübingen die Dissertation, die ich im Sommersemester 1980 abschloß.

Im März 1981 legte ich den 2. Teil des Staatsexamens ab und beendete das Medizinstudium mit dem 3. Teil des Staatsexamens am 27. April 1982.